

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET

Dragan Manojlović, dr. med.

UTJECAJ HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA MODULACIJU
MAKROVASKULARNE REAKTIVNOSTI U ŠTAKORICA S *DIABETES MELLITUS*
TIP I

Doktorska disertacija

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET

Dragan Manojlović, dr. med.

UTJECAJ HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA MODULACIJU
MAKROVASKULARNE REAKTIVNOSTI U ŠTAKORICA S *DIABETES MELLITUS*
TIP I

Doktorska disertacija

Osijek, 2019.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med.

Rad ima 67 stranica.

Ovo istraživanje provedeno je uz potporu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku, VIF2016-MEFOS-19 „Modulacija oksidacijskog stresa i upalni odgovor hiperbaričnom oksigenacijom u makro- i mikrocirkulaciji štakora Sprague-Dawley“ (PI: Drenjančević, I.) i VIF2017-MEFOS-04 „Modulacija oksidativnog stresa i upalni odgovor hiperbaričnom oksigenacijom u BALB/c miševa i Sprague-Dawley štakora“ (PI: Drenjančević, I.).

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ines Drenjančević, na svesrdnoj i nesebičnoj pomoći, stručnim savjetima, ukazanom povjerenju i razumijevanju tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Ani Stupin, dr. med.; dr. sc. Sanji Novak, prof. molekularne biologije; dr. sc. Aniti Matić, proc. ing.; doc. dr. sc. Ivani Jukić, dr. med.; dr. sc. Zrinki Mihaljević, prof. biologije te svim kolegama i suradnicima iz Laboratorija za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku na nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Posebna zahvala mojoj dragoj obitelji – Ani, Marku i Mirei Manojlović na strpljenju i razumijevanju tijekom izvođenja pokusa i pisanja rada te mojim roditeljima i sestri na podršci i potpori.

Sadržaj

POPIS KRATICA.....	I
POPIS TABLICA	III
POPIS SLIKA.....	IV
1. UVOD.....	1
1.1. Krvožilno stablo i njegova građa	1
1.2. Fiziološki mehanizmi vazodilatacije	2
1.3. Sinteza dušik(II)-oksida (NO).....	3
1.4. Metabolizam arahidonske kiseline	4
1.5. Sinteza prostanoida.....	5
1.6. Čimbenici hiperpolarizacije endotelnog podrijetla (EDHF).....	5
1.7. Kisik, kisikovi radikali i oksidativni stres	6
1.8. Poremećaj vaskularne reaktivnosti u slučaju diabetesa mellitus-a	7
1.9. Terapija hiperbaričnim kisikom	11
2. HIPOTEZA.....	12
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	13
4. MATERIJALI I METODE.....	14
4.1. Priprema pokusnih skupina.....	15
4.2. Protokoli za izlaganje hiperbaričnom kisiku	15
4.3. <i>In vitro</i> izolirane perfundirane torakoabdominalne aorte	16
4.4. Eksperimentalni protokoli za utvrđivanje mehanizama vaskularne reaktivnosti	17
4.4.1. Prvi protokol.....	17
4.4.2. Drugi protokol	17
4.4.3. Treći protokol.....	17
4.4.4. Četvrti protokol	17
4.4.5. Peti protokol	17
4.5. Određivanje mRNA	18
4.6. Mjerenje oksidativnog stresa.....	19
4.7. Statističke metode	20
5. REZULTATI	21
5.1. Uloga 20-HETE u makrovaskularnoj reaktivnosti ovisnoj o endotelu kod ženki dijabetičkih štakora	21
5.2. Utjecaj HBOT-a na funkciju krvnih žila i specifične mehanizme kojima HBOT utječe na relaksaciju aortnih prstenova potaknutu acetilkolinom kod zdravih i dijabetičkih štakorica	27
6. RASPRAVA	33
7. ZAKLJUČCI.....	42
8. SAŽETAK.....	43
9. SUMMARY.....	45
10. LITERATURA	47
11. ŽIVOTOPIS.....	64

POPIS KRATICA

2-AG	– 2-arahidon glicerol
20-HETE	– 20-hidroksieikozatrinoične kiseline
AA	– arahidonska kiselina
AChIR	– acetilkolinom inducirana relaksacija
ADMA	– dimetil arginin
AGEs	– napredni završni produkti glikacije
ATP	– adenzin trifosfat
BH 4	– tetrahidrobiopterin
BK	– bradikinin
cAMP	– ciklički adenzin monofosfat
cGMP	– ciklički gvanozin monofosfat
COX	– ciklooksigenaza
COX-1	– ciklooksigenaza 1
COX-2	– ciklooksigenaza 2
CTR	– kontrola
CYP2J3	– citokrom P450 2J3
CYP4A1	– citokrom P450 4A1
CYP4A3	– citokrom P450 4A3
DAG	– diacilglicerol
DM	– <i>diabetes mellitus</i>
DNA	– deoksiribonukleinska kiselina
ECM	– ekstracelularni matriks
EDHF	– endotel derivirajući hiperpolarizirajući čimbenik
EDTA	– etilendiamintetraoctena kiselina
EETs	– epoksieikozatrinoične kiseline
ET1	– endotelin 1
eNOS	– endotelna NO-sintetaza
FAD	– flavin adenin dinukleotid
FMN	– flavin mononukleotid
FRAP	– antioksidativni kapacitet plazme (prema engl. <i>Ferric Reducing Ability of Plasma</i>)
GFAT	– fruktoza-6-fosfat amidotransferaza
HBOT	– hiperbarična oksigenoterapija
HDL	– lipoproteini velike gustoće
HET0016	– N-hidroksi-N'-(4-butil-2-metilfenil)-formamidin
HETEs	– hidroksieikozatrinoične kiseline
H ₂ O ₂	– hidrogen peroksid
HClO	– hiperklorična kiselina
HO·	– hidroksil radikal
HPRT	– hipoksantin- guanin phosphoribozil transferaza
IL-6	– interleukin-6

iNOS	– inducibilna NO-sintetaza
IP ₃	– inozitoltrifosfat
KCl	– kalijev klorid
KVB	– kardiovaskularna bolest
LDL	– lipoproteini male gustoće
L-NAME	– N omega-Nitro-L-arginin metil ester hidroklorid
MDA	– malondialdehid
mRNA	– glasnička ribonukleinska kiselina
MS-PPOH	– N-Metilsulfonil-6-(2-propargiloksifenil)heksanamide; N-(Metilsulfonil)-2 (2-propin-1-iloksi)benzeneheksanamid
mtNOS	– mitohondrijska NOS
NADPH	– nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NO	– dušik (II) oksid
NOS	– NO-sintetaza
nNOS	– neuronalna NO-sintetaza
O ²⁻	– superoksid
ONOO	– peroksinitrit
OVX	– ovarijskomirano
PAF	– čimbenik aktivacije trombocita
PAI-1	– inhibitor aktivacije plazminogena 1
PGI ₂	– prostaglandin I ₂
PKC	– protein-kinaza C
ROS	– reaktivne kisikove vrste
SD	– Sprague-Dawley
SEM	– standardna pogreška aritmetičke sredine (prema engl. <i>Standard Error of the Mean</i>).
SNP	– natrij nitroprusid
SNPIR	– natrij nitropusidom inducirana relaksacija
SOD	– superoksid dismutaza
TBA	– tiobarbiturna kiselina
TBARS	– reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline
TBXAS1	– tromboksan A sintetaza 1
TCA	– trikloroctena kiselina
TGF-β1	– transformirajući čimbenik rasta β1
TNF-α	– tumor nekrotizirajući čimbenik α
TXA ₂	– tromboksan A ₂
UDP-GlcNAc	– uridin difosfat N-acetilglukozamin

POPIS TABLICA

Tablica 4.1. Sljedovi prilagođenih početnica za određivanje ekspresije mRNA.	18
Tablica 5.1. Tjelesna masa, glukoza u krvi i razina oksidativnog stresa štakorica u dobi od 12 tjedana	21
Tablica 5.2. Relativna ekspresija mRNA za eNOS, iNOS, COX-1, COX-2, TBXAS1, CYP2J3, CYP4A1 i CYP4A3; HPRT1 u tkivu torakalne aorte (N = 5).	26
Tablica 5.3. Tjelesna masa, koncentracija glukoze i razina oksidativnog stresa u krvi eksperimentalnih životinja (u dobi od 12 tjedana).	27
Tablica 5.4. Relativna ekspresija mRNA za eNOS, iNOS, COX-1, COX-2, TBXAS1, CYP2J3, CYP4A1 i CYP4A3 u tkivu torakalne aorte.	32

POPIS SLIKA

Slika 1.1. Aneurizma arterije popliteje kao posljedica ateroskleroze – vlastita slika	2
Slika 1.2. Metabolizam arahidonske kiseline – slobodan pristup	4
Slika 4.1. Shema sustava za izolirane aortne prstenove – nacrtano prema ilustraciji (111).....	16
Slika 5.1. ACh inducirana relaksacija (AChIR) izoliranih aortnih prstenova štakorica u CTR, DM, CTR + HBOT i DM + HBOT skupini štakorica.....	22
Slika 5.2. Mehanizmi acetilkolinom (AChIR) inducirane relaksacije izoliranih aortnih prstenova štakorica u CTR (panel A), DM (panel B), CTR + HBOT (panel C) i DM + HBOT skupini štakorica (panel D).....	23
Slika 5.3. SNP inducirana relaksacija (SNPIR) izoliranih aortnih prstenova štakorica u CTR, DM, CTR + HBOT i DM + HBOT skupini štakorica.....	25
Slika 5.4. Osnovni AChIR izoliranih aortnih prstenova štakorica u svim eksperimentalnim skupinama SD štakorica	28
Slika 5.5. Mehanizmi acetilkolinom induciranog relaksacijskog odgovora (AChIR) izoliranih aortnih prstenova štakorica u OVX-CTR i OVX-DM štakorica.....	30

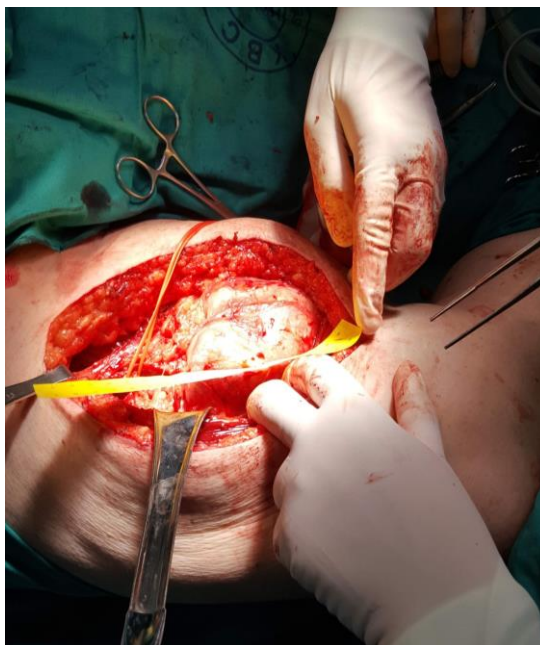
1. UVOD

Šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*) (DM) kronična je metabolička bolest koju karakterizira poremećaj u metabolizmu ugljikohidrata, masti i bjelančevina. Ona nastaje zbog apsolutnog ili relativnog manjka inzulina, inzulinske rezistencije, povećanog stvaranja glukoze te pojačane aktivnosti antiinzulinskih hormona (glukagon, hormon rasta, adrenalin, spolni hormoni, kortikosteroidi, hormoni štitnjače) (1). Možemo govoriti o dva tipa šećerne bolesti: tipu 1 i tipu 2 (2). Tip 1 dijabetesa nastaje autoimunom destrukcijom β stanica gušterače (3). Najčešće se razvija u djece i mlađih odraslih osoba. Tip 2 šećerne bolesti obično počinje kao inzulinska rezistencija, gdje stanice ne koriste inzulin na odgovarajući način. Ovaj tip šećerne bolesti najčešće pogađa odrasle osobe od 40 godina naviše (3). Posljedice dugotrajne bolesti komplikacije su na krvnim žilama (makroangiopatija i mikroangiopatija), živcima i bazalnim membranama različitih tkiva (4). Uslijed mikroangiopatije razvija se retinopatija i nefropatija s posljedičnom sljepoćom i otkazivanjem bubrežne funkcije, a kao posljedica makroangiopatije razvija se koronarna arterijska bolest, cerebrovaskularne bolesti te periferne vaskularne bolesti, koje zajedno s neuropatijom dovode do razvoja tzv. dijabetičkog stopala – kroničnog ulkusa donjih ekstremiteta dijabetičkih bolesnika (5, 6). Promjene na krvnim žilama u sklopu šećerne bolesti najviše se očituju u promjeni vaskularne reaktivnosti, odnosno endotelnoj disfunkciji. Točni mehanizmi kojima se to odvija još uvijek nisu u cijelosti poznati. Stoga je potrebno provesti dodatna istraživanja kako bi se rasvijetlili mehanizmi nastanka šećerne bolesti i njezine komplikacije te otkrile nove mogućnosti uspješnijeg liječenja.

1.1. Krvožilno stablo i njegova građa

Uzimajući u obzir promjer krvnih žila, krvožilni sustav možemo podijeliti na mikrocirkulaciju i makrocirkulaciju (promjer veći od 0,1 mm) (7). U građi većih krvnih žila razlikujemo tri sloja: unutarnji (endotel), središnji (mišićni sloj) i vanjski sloj (adventicija). Endotel (lat. *tunica intima*) građen je od endotelnih stanica i subendotelnog vezivnog tkiva. Mišićni sloj (lat. *tunica media*) građen je od koncentrično raspoređenih glatkih mišićnih stanica te kolagena, elastina, proteoglikana i glikoproteina. Postoje određene razlike u građi stijenke različitih krvnih žila. Tako arterije imaju najdeblju stijenku od svih krvnih žila pa je mišićni sloj arterija deblji od mišićnog sloja vena iste veličine. Arteriole imaju tanji mišićni sloj, nemaju unutarnju elastičnu membranu, završavaju sa završnim arteriolama (metaarteriole) koje nemaju kontinuirani mišićni sloj (7). Makrovaskularna bolest (ateroskleroza) (Slika 1.1.), koja pogađa velike krvne žile, temeljni je uzrok morbiditeta i mortaliteta u ljudi s dijabetesom (8). Ultrastrukturalne

promjene na krvnim žilama u sklopu šećerne bolesti uključuju: povećanje akumulacije proteina ekstracelularnog matriksa (ECM), migraciju glatkih mišićnih stanica, nepravilnu citoplazmu glatkih mišićnih stanica i alteraciju endotela (9).



Slika 1.1. Aneurizma arterije popliteje kao posljedica ateroskleroze – vlastita slika

Endotelne stanice glavni su regulator vaskularne homeostaze, stupajući u međureakcije s cirkulirajućim stanicama s jedne strane te sa stanicama krvožilnog zida i glatkim mišićnim stanicama s druge strane. One su poligonalnog oblika, izdužene u smjeru krvne struje i velikih dimenzija 10 x 30 μm (10). Endotelno tkivo je multifunkcionalno i sudjeluje u regulaciji različitih procesa kao što su: koagulacija i fibrinoliza, regulacija vaskularnog tonusa, sudjelovanje u upalnim i imunološkim procesima i neoangiogenezi (11). To čini izlučivanjem različitih vazoaktivnih i prokoagulantnih-antikoagulantnih tvari, citokina te promjenama izražaja staničnih adhezivnih molekula na svojoj površini.

1.2. Fiziološki mehanizmi vazodilatacije

U fiziološkim uvjetima postoje dva načina vazodilatacije: vazodilatacija ovisna o endotelu i vazodilatacija neovisna o endotelu. Vazodilatacija ovisna o endotelu odvija se trima različitim mehanizmima: sintezom dušik(II)-oksida (NO), sintezom prostanoida te sintezom čimbenika hiperpolarizacije endotelnog podrijetla (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF) (12). Vazodilatacija neovisna o endotelu nastaje živčanom stimulacijom, najčešće

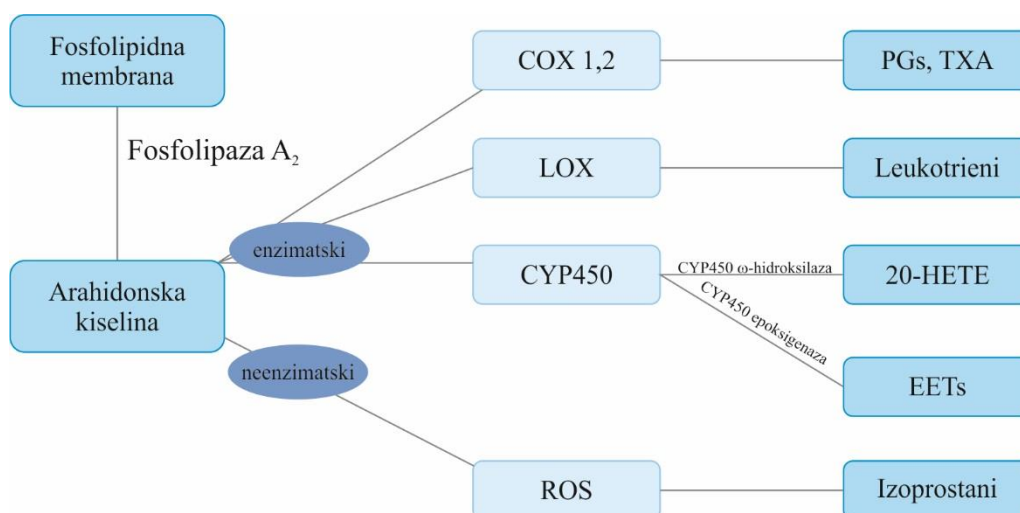
kolinergičnim putem (acetilkolin) te egzogenom primjenom izravnih NO donora, kao što je natrij-nitroprusid (13, 14). To je posljedica izravnog djelovanja NO, koji se oslobađa iz lijeka te u vaskularnoj glatkoj mišićnoj stanici pokreće signalni put dušik(II)-oksida.

1.3. Sinteza dušik(II)-oksida (NO)

NO nastaje iz aminokiseline L-arginina pomoću NO-sintetaze (NOS). NOS je enzim iz obitelji oksidoreduktaza te postoji u tri izoforme, kao neuronalna (nNOS), inducibilna (iNOS) i endotelna (eNOS) NO-sintetaza. eNOS je enzim ovisan o kalciju, što znači da mu je za aktivaciju potreban kalcij-kalmodulin kompleks te još nekoliko kofaktora za samu sintezu NO: nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinukleotid (FAD), flavin mononukleotid (FMN), ion željeza i tetrahidrobiopterin (BH_4) (15). Aktivaciju eNOS-a uzrokuju brojni agonisti G-protein vezanih receptora (acetilkolin) i fiziološki poticaji (tangencijalno istezanje endotela kao posljedica mehaničkog podražaja samim krvnim protokom, engl. *sheer stress*) (16, 17). Nastali NO difuzijom dolazi u glatku mišićnu stanicu, gdje aktivira enzim gvanilat ciklazu i povećava količinu cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP) (18). cGMP zatim smanjuje ulazak kalcijevih iona u glatku mišićnu stanicu te se ona opušta i dolazi do vazodilatacije. cGMP, također, uzrokuje fosforilaciju kalijevih kanala, što dovodi do hiperpolarizacije membrane glatke mišićne stanice s posljedičnom vazodilatacijom (19). Egzogeni L-arginin povećava sintezu NO te time povećava NO-ovisnu vazodilataciju (20). NO sudjeluje u brojnim fiziološkim funkcijama u mitohondrijima. U natjecanju je s kisikom za interakciju s citokrom oksidazom i djeluje kao inhibitor respiratornog lanca u mitohondriju. Pri većim koncentracijama NO ulazi u interakciju s kompleksom II i kompleksom III te ireverzibilno blokira respiraciju i sintezu ATP-a (adenozin trifosfata). Osim toga, reagira sa superoksidom i formira peroksinitrit, koji potom aktivira protein kinazu C i otvara mitohondrijske kalijске kanale ovisne o ATP-u (21). Neki su autori smatrali da proizvodnja NO u mitohondrijima nastaje djelovanjem eNOS izoforme, dok su drugi smatrali da postoji četvrta vrsta izoenzima, mitohondrijska NOS (mtNOS) (22). Lacza i suradnici (21) dokazali su postojanje mtNOS-a. Ovaj je enzim potpuno ovisan o kalmodulinu, molekularne težine 140 kDa. Također su pokazali da se aktivnost mtNOS-a znatno povećava tijekom hipoksije. Najveći je krivac za oštećenje stanice tijekom hipoksije stvaranje veće količine superoksida u mitohondrijskom respiratornom lancu.

1.4. Metabolizam arahidonske kiseline

Arahidonska kiselina nezasićena je esencijalna masna kiselina. Tri su osnovna puta kojima endotelna stanica metabolizira arahidonsku kiselinu pomoću tri enzimska sustava: ciklooksigenaze, lipooksigenaze te CYP450 enzima, od kojih su u vaskularnoj funkciji najvažniji CYP450-omega hidroksilaza te CYP450-epoksigenaza (23). Kada se acetilkolin veže na svoj receptor, dolazi do fosforilacije membrane, a fosfatidilinozitol koji se nalazi na membrani ulazi u interakciju s fosfolipazom C pri čemu nastaje diacilglicerol (DAG) i inozitoltrifosfat (IP₃). Na DAG potom djeluje diglicerid lipaza te nastaje 2-arahidon glicerol (2-AG), a nakon djelovanja monoglicerid lipaze iz 2-AG nastaje slobodna arahidonska kiselina (AA) i glicerol.



Slika 1.2. Metabolizam arahidonske kiseline – slobodan pristup

Epoksigenaza je enzim iz obitelji citokrom P450, koji u endotelnoj stanici stvara 4 izomera epoksieikozatrinoične kiseline (EETs), od kojih su 14,15-EETs i 11,12-EETs glavni aktivni metaboliti. EETs-i djeluju kao autokrini i parakrini lipidni medijatori (24, 25), koji imaju protuupalni učinak na krvne žile i bubrege te štite miokard i mozak od ishemičnih oštećenja (26, 27, 28). Nisu zabilježeni dokazi produkcije EETs-a u glatkoj mišićnoj stanici. Citokrom P450 ω-hidroksilaza u glatkoj mišićnoj stanici potiče proizvodnju 20-hidroksieikozatrinoične kiseline (20-HETE), koja je vazokonstriktor. Ciklooksigenaza (COX) je enzim koji sudjeluje u sintezi prostanoida iz AA. Lipooksigenaza je enzim koji iz AA stvara 12- i 15-hidroksieikozatrinoične kiseline (HETEs), kao glavne aktivne metabolite u endotelnoj stanici (Slika 1.2.) (29).

1.5. Sinteza prostanoida

Ciklooksigenaza (COX) ili prostaglandin-endoperoksid sintaza je enzim koji katalizira pretvorbu arahidonske kiseline u različite prostanoide. Identificirane su dvije izoforme ovoga enzima: COX-1 i COX-2. COX-1 konstitucijski je izražen u većini tkiva i igra ključnu ulogu u normalnim fiziološkim funkcijama, dok je COX-2 inducibilna izoforma koju reguliraju citokini, mitogeni, hormoni i čimbenici rasta (30). Nastali prostanoide djeluju oprečno, jedni uzrokuju vazodilataciju (prostaglandin D_2 , prostaglandin E_2 i prostaciklin I_2), a drugi vazokonstrikciju (prostaglandin $F_{2\alpha}$ i tromboksan A_2). Hipoksija aktivira COX pri čemu većinom nastaje prostaciklin, PGI_2 , te on potom difuzijom ulazi u glatku mišićnu stanicu u kojoj aktivira enzim adenilat ciklazu te se povećava količina cikličkog adenozin monofosfata (cAMP). cAMP potiče otvaranje više vrsta kalijevih kanala pri čemu nastaje hiperpolarizacija membrane glatke mišićne stanice s posljedičnom vazodilatacijom (23).

1.6. Čimbenici hiperpolarizacije endotelnog podrijetla (EDHF)

EDHF-ima pripada nekoliko različitih molekula: ioni kalija, vodikov peroksid (H_2O_2) i epoksieikozatrinoična kiselina (EETs). Smatra se da neki od njih mogu uzrokovati hiperpolarizaciju tzv. mioendotelnim tijesnim spojevima. U većini se slučajeva vazodilatacija događa kada na određeni podražaj endotelne stanice u stanicu ulaze ioni kalcija i otvaraju više vrsta kalijevih kanala na endotelnoj i glatkoj mišićnoj stanici (31, 32). EETs nastaje iz arahidonske kiseline aktivacijom enzima citokrom P450-epoksigenaze. EETs zatim uzrokuje hiperpolarizaciju glatke mišićne stanice otvaranjem velikih konduktivnih kalcijem aktiviranih kalijevih kanala (31). Hiperpolarizacija inhibira kalcijeve kanaleovisne o naponu i tako spriječava ulazak iona kalcija u glatku mišićnu stanicu čime nastaje vazodilatacija (33). EDHF-i igraju veću ulogu u vazodilataciji u manjim otporničkim arterijama, nego u velikim provodnim arterijama (33, 34, 35). H_2O_2 aktivira topljivu gvanilat ciklazu i tako dovodi do vazodilatacije (36). Uloga različitih vazoaktivnih medijatora može se pokazati na učinku bradikinina. Bradikinin je vazoaktivna tvar iz sustava kinin-kalikreina, a djeluje preko dvaju tipova G-protein receptora: BK_1 receptora nađenih na neuronima i fibroblastima koji se nalaze u adventiciji cerebralnih arterija te BK_2 receptora koji su zastupljeni u svim slojevima cerebralnih krvnih žila. Vazodilatacija potaknuta bradikininom odvija se sintezom NO te sintezom vazodilatacijskih prostaglandina, a bradikinin se također pokazao i kao medijator u otpuštanju EDHF-a, uglavnom vodikova peroksida (37). Lacza i suradnici kao modele su koristili novorođene praščiće te izlagali žile inhibitorima NOS-a i COX-a, nakon čega su uvidjeli da

ipak postoji vazodilatacijski odgovor na bradikinin, koji je u potpunosti ovisan o endotelu. To su pripisali BK₂ receptorima na endotelu koji su potakli na oslobađanje vodik peroksida, a koji je potom aktivirao kalijске kanale ovisne o ATP-u i uzrokovao vazodilataciju (37). Vazodilatacija neovisna o endotelu nastaje živčanom stimulacijom najčešće kolinergičnim putem (acetilkolin) te egzogenom primjenom izravnih NO donora kao što je natrij-nitroprusid (38).

1.7. Kisik, kisikovi radikali i oksidativni stres

Metabolizam stanice pretežno ovisi o kisiku (oksidativnom ili aerobnom metabolizmu), pri čemu je isporuka kisika temeljni čimbenik. Povećanjem parcijalnog tlaka kisika, kao što se događa tijekom hiperbarične oksigenacije, topljivost kisika u plazmi, njegova dostava do tkiva i oksigenacija tkiva se povećavaju. No kisik je visoko reaktivna molekula, zbog čega pri visokim parcijalnim tlakovima, kao pri hiperbaričnoj oksigenaciji, dolazi do formiranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (39). Stoga oksidativni stres možemo definirati kao narušavanje ravnoteže između produkcije reaktivnih metabolita kisika (ROS) i antioksidativnog kapaciteta (40). Antioksidansi su vitamin A, vitamin C, β-karoten i hem vezani proteini, dok su enzimi koji sudjeluju u uništavanju kisikovih radikala superoksid dismutaza (SOD), katalaza i glutathion peroksidaza (41). Kisik na substaničnoj (enzimatskoj) razini sudjeluje u mnogim biokemijskim reakcijama, npr. biosintezi adenozin trifosfata (ATP), aerobnoj glikolizi, β-oksidaciji masnih kiselina i oksidativnoj fosforilaciji. U slučaju ozljede tkiva aktivira se NADPH-oksidaza (enzim kojem je za djelovanje također potreban kisik), koja će u leukocitima proizvoditi veću količinu oksidanata, koji potom služe za sprječavanje infekcije u oštećenom tkivu. Kisik također sudjeluje u proliferaciji fibroblasta te sintezi kolagena koji se pojačano stvara u oštećenom tkivu (41). Kisikovi radikali izravno smanjuju raspoloživost NO tako što NO reagira sa superoksidom i formira peroksinitrit (ONOO-) i neizravno utječu na bioraspoloživost NO time što oksidiraju BH₄ i mijenjaju svrhu eNOS-a, koja umjesto NO proizvodi superoksid. Kisikovi radikali, također, djeluju na NO receptor – topljivu gvanilil-ciklazu, oksidirajući hem i smanjujući djelovanje NO. Enzimi odgovorni za proizvodnju kisikovih radikala su: ksantin oksidaza, COX, lipooksigenaza, nevezani eNOS, citokrom P450, mitohondrijski elektronski lanac, ali najvažnija je NADPH oksidaza. Kisikovi radikali su: superoksid (O²⁻), hidroksil radikal (HO·), hidrogen peroksid (H₂O₂), hiperklorična kiselina (HClO) i peroksinitrit (ONOO-) (42). Kisikovi radikali smanjuju staničnu razinu NO, utječu na povećanu ekspresiju adhezijskih molekula

(P-selektin), povećavaju razinu trombocitnog aktivirajućeg čimbenika (eng. *platelet activating factor*; PAF), leukotriena B4 te citokina (IL-8). Sve to dovodi do endotelne disfunkcije (41). Kisikovi radikali reagiraju s LDL-om, koji potom ometa endotelnu proizvodnju NO tako što smanjuje izražaj eNOS-a, smanjuje unos L-arginina u endotelnu stanicu te povećava razinu asimetričnog dimetil arginina (ADMA), a to rezultira disfunkcijom endotela (41). Istraživanja u kojima se koristila superoksid dismutaza pokazala su njezino pozitivno djelovanje na oštećenu vazodilataciju ovisnu o endotelu kod provodnih i otporničkih arterija životinja s dijabetesom (43, 44, 45, 46). Nasuprot tome, postoje istraživanja koja nisu pokazala taj pozitivan učinak SOD-a na vazodilataciju (47, 48). Razloge za ove proturječne rezultate treba tražiti u trajanju dijabetesa, vrsti eksperimentalnih životinja, veličini hiperglikemije, različitim eksperimentalnim protokolima te različitim vrstama tkiva (36, 49).

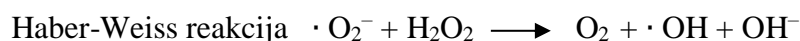
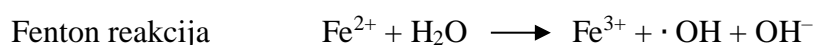
1.8. Poremećaj vaskularne reaktivnosti u slučaju dijabetesa melitusa

Hiperglikemija je obilježje i dijagnostički kriterij dijabetesa te dobro poznati neovisni čimbenik rizika za kardiovaskularne bolesti (50). Meta analize pokazale su povišenu razinu rizika za kardiovaskularne bolesti u osoba s povišenom razinom glikoliziranog hemoglobina HbA1c i u bolesnika s dijabetesom tipa I i tipa II. Ova neenzimska glikacija bjelančevina rezultira time da se glukoza bez utjecaja enzima kemijski vezuje za proteine (51). Brojna istraživanja dokazuju poremećenu vaskularnu reaktivnost kod DM-a, pojačanu reaktivnost na vazokonstriktore i oslabljenu reaktivnost na vazodilatatore (52, 53, 54, 55, 56, 57). Najčešće upotrebljavani vazodilatator u pokusima je acetilkolin kao primjer vazodilatacije ovisne o endotelu. Kod streptozocin induciranog DM-a u štakora, mnoge studije pokazuju oslabljen vazodilatacijski odgovor na acetilkolin (58, 59). Hiperglikemija je polazni stadij u razvoju endotelne disfunkcije kod dijabetičkih bolesnika. Ona potiče aktivaciju protein kinaze C (PKC), oksidaciju i aktivaciju poliol puta te formiranje napredno glikoziliranih završnih produkata (eng. *advanced glycation end products*, AGEs) (60). Ova neenzimska glikacija bjelančevina rezultira time da se glukoza bez utjecaja enzima kemijski vezuje za bjelančevine (61). Sve to dovodi do vezivanja regulacijskih molekula, križnog vezivanja bjelančevina, promjene aktivnosti enzima, osjetljivosti na proteolizu, makromolekularnog prepoznavanja, imunogenosti i endocitoze, što mijenja različite fiziološke procese u organizmu i dovodi do razvoja kroničnih komplikacija šećerne bolesti (62). Glicirane bjelančevine plazme vežu se za odgovarajuće receptore na membranama endotelnih stanica i monocita te ih aktiviraju. Glikacija antimikrobnih bjelančevina neutrofila smanjuje njihovu baktericidnost. Visoke vrijednosti šećera u krvi

smanjuju fagocitnu aktivnost leukocita i njihovu migraciju. Aktivirani makrofagi slobodnim radikalima kisika oštećuju ishemična i slabo hranjena tkiva. Sve to dijabetičke bolesnike čini pojačano sklonima infekcijama (63). Osim bjelančevina, glicirati se mogu i nukleinske kiseline, a čime se objašnjava i veća učestalost prirođenih abnormalnosti u djece majki s dijabetesom uslijed neenzimske glikacije deoksiribonukleinske kiseline (DNA) (64). Toksično djelovanje glukoze nastaje četirima glavnim mehanizmima, a to su: poliolski put, heksozaminski put, protein kinazni put i put završnih produkata napredne glikacije (65). Oni nam pružaju dokaze da visoka razina glukoze u krvi potiče staničnu disfunkciju i oštećenje (66). Poliololski put uključuje enzim aldoza reduktazu, koji reducira glukozu do sorbitola koristeći nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) kao kofaktor. U uvjetima hiperglikemije, potrošnja raste kako se višak glukoze preusmjerava iz glikolize u poliolski put metaboliziranja do sorbitola. Budući da je NADPH potreban za obnovu reduciranog glutationa (intracelularni antioksidant), njegova potrošnja smanjit će razinu reduciranog glutationa, a favorizirat će se stvaranje reaktivnih metabolita kisika. Sve to dovodi do redoks neravnoteže i oksidativnog stresa, koji su uključeni u patogenezu kardiovaskularnih komplikacija kod dijabetesa (67). U uvjetima hiperglikemije aktivira se put završnih produkata napredne glikacije, što je praćeno neenzimskom glikacijom slobodnih amino skupina proteina, lipida i nukleinskih kiselina sa stvaranjem završnih produkata napredne glikacije (68). Nakupljanje AGEs-a u krvnim žilama i srcu može dovesti do funkcionalnih i strukturalnih abnormalnosti (69, 70). Štetni učinci AGEs-a ogledaju se u posredovanju križnog vezanja intra- i ekstracelularnih proteina i interakciji s receptorima za AGEs na površini stanice. Stoga, stvaranje AGEs-a u dijabetičara može ubrzati upalu i oksidativni stres, pogoršavajući njihove kardiovaskularne komplikacije (71). U heksozaminskom putu, fruktoza-6-fosfat, intermedijarni produkt glikolize, pretvara se u glukozamin-6-fosfat uz pomoć enzima fruktoza-6-fosfat amidotransferaze (GFAT), a potom se metabolizira do uridin difosfat N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc). U uvjetima hiperglikemije, aktivacija heksozaminskog puta povećava transkripciju gena za transformaciju čimbenika rasta (TGF- β 1) i inhibitora aktivacije plazminogena-1 (PAI-1), kao i upalnih citokina (tumor nekrotizirajući čimbenik α , TNF- α , i interleukina-6, IL-6). Ovi su geni povezani s fibrozom, upalom i aterotrombozom te porastom dijabetičkih vaskularnih komplikacija (62). Kod protein kinaza C (PKC) puta, povišena intracelularna razina glukoze u sklopu dijabetesa povećava sintezu diacilglicerola, postupno aktivirajući izoforme proteinkinaze β i δ (PKC- α i PKC- δ). Aktivacija PKC puta vodi do promjene vaskularnog permeabiliteta, kontraktilnosti, protoka krvi i koagulacije, smanjujući ekspresiju endotelina-1, vaskularnog endotelijalnog čimbenika rasta i inhibitora aktivacije plazminogena-1 (64). Dolazi do strukturalnih

abnormalnosti koje uključuju zadebljanje bazalne membrane i akumulacije sastavnica ekstracelularnog matriksa kao što su kolagen i fibronektin, a što se može povezati s prekomjernom ekspresijom transformirajućeg čimbenika rasta $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) i čimbenika rasta vezivnog tkiva. Sve to za posljedicu ima razvoj ateroskleroze, vaskularne disfunkcije i dijabetičke kardiomiopatije (72). Akutna hiperglikemija u pokusima na izoliranim žilama pokazuje značajno smanjenu vazodilataciju ovisnu o proizvodnji NO i smanjenu vazodilataciju potaknutu protokom (73). NO ima predominantnu ulogu u vazodilataciji velikih provodnih arterija, dok EDHF ima predominantnu ulogu u vazodilataciji otporničkih arterija. Također je povećana uloga EDHF-a u vazodilataciji provodnih arterija u stanjima poremećene aktivnosti NO (74). Postoje brojni biološki markeri koje možemo mjeriti i time dokazati endotelnu disfunkciju: odnos između citrulina i arginina (indeks NOS-aktivnosti), asimetrični dimetilarginin (ADMA) (potencijalni endogeni inhibitor NOS-a), mijeloperoksidaza i C reaktivni protein (75, 76, 77, 78). U slučaju dijabetesa melitusa dolazi do povećanog stvaranja metiliranog L-arginina, odnosno asimetričnog dimetilarginina (ADMA) (79). ADMA djeluje kao endogeni inhibitor NOS-a (80), time smanjujući proizvodnju NO i utječući na smanjenje vazodilatacije, npr. uzrokovane smicanjem. Također, ADMA povećava proizvodnju superoksida, a time i vazokonstrikciju arteriola (80). Lash i suradnici (81) ispitali su utjecaj akutne lokalne primjene glukoze na mišićne arterije. Dokazali su da je razina NO u arterijama nakon primjene glukoze i nakon primjene acetilkolina značajno smanjena, ali da je vazodilatacija na acetilkolin ostala očuvana, što je u suprotnosti s arterijama iz drugih tkiva. Hink i suradnici (82) istraživali su ekspresiju eNOS-a na aorti u kontrolnih i streptozocin induciranih štakora s dijabetesom. Budući da je bioraspoloživost NO u dijabetesu smanjena, smatralo se da je i smanjena ekspresija eNOS-a, no ovi su autori otkrili da je ekspresija eNOS-a čak tri puta veća u slučaju dijabetesu (82). Koronarne arterije u zdravih kontrolnih miševa ostvaruju vazodilataciju induciranu acetilkolinom, 50 % preko stvaranja NO, a 50 % preko stvaranja EDHF-a, dok je taj omjer kod spontano dijabetičkih miševa s DM-om tipa 2 (db/db) u korist stvaranja EDHF-a 81 % (83). Osobe s dijabetesom imaju povećanu razinu endotelina 1 (ET1) u serumu, a uzrok tome je hiperglikemija. Ta povećana koncentracija ET1 uzrokuje smanjenu osjetljivost endotelnih ET_B receptora (84, 85, 86). Sve skupa rezultira smanjenim vazokonstriktornim odgovorom, što se pokazalo i u studijama na životinjama na izoliranim aortnim prstenovima dijabetičkih štakora (87). Stimulacija torakalne aorte natrij nitroprusidom nakon 8 tjedana trajanja dijabetesa pokazuje poremećeni vazodilatacijski odgovor, nakon 8 tjedana dijabetesa povećana je sinteza PGI₂, dok se kasnije razvija povećani vazokonstriktorni utjecaj metabolita COX-a (88). Odnos u stvaranju PGI₂ i TXA₂ u aorti i mezenteričnim žilama

nakon 120 – 180 dana trajanja dijabetesa je smanjen, dok taj odnos ostaje nepromijenjen nakon 30 dana trajanja dijabetesa (89). Zbog stvaranja velike količine kisikovih radikala u dijabetesu i njegovih utjecaja na poremećenu vaskularnu reaktivnost, posebno na vazodilataciju, brojni autori upotrebljavaju različite kelatore te enzime koji uništavaju kisikove radikale da bi utvrdili koji od njih najviše remeti vaskularnu funkciju. Pieper i suradnici (36) ispitivali su koliki je utjecaj hidroksil radikala ($\cdot\text{OH}$) u poremećenom vaskularnom odgovoru. Koristili su kombinaciju superoksid dismutaze kao enzima koji uklanja superoksid te katalazu koja stvara vodu i molekularni kisik iz vodik peroksida. Superoksid i vodik peroksid zajednički utječu na poremećen vaskularni odgovor u dijabetesu. Hidroksil radikal može nastati dvjema reakcijama:



Kao model koristili su aortu streptozocinom induciranih dijabetičkih štakora. DETAPAC je metalni ionski intracelularni kelator koji inhibira hidroksil radikal, dok je manitol ekstracelularni čistač hidroksil radikala. Upotrebljavajući oba inhibitora došli su do zaključka da se hidroksil radikal stvara unutar stanice (endotela) dijabetičkih štakora jer manitol nije uspio inhibirati utjecaj hidroksil radikala na poremećenu acetilkolin induciranu vazodilataciju kod dijabetičkih štakora, dok je inhibicija s DETAPAC-om uspjela te je vazodilatacijski odgovor na acetilkolin bio povećan. Inzulin također utječe na vaskularnu reaktivnost, posebno na vazodilataciju, te je studijama na životinjama (90) i ljudima (91) dokazano da kronična primjena inzulina u dijabetesu može ispraviti poremećeni vazodilatacijski odgovor ovisan o endotelu. Dokazano je da inzulin potencira veću proizvodnju NO, povećavanjem količine mRNA za eNOS (92). Inzulin u fiziološkoj niskoj koncentraciji potiče smanjeni vazokonstriksijski odgovor na noradrenalin potkožnih otporničkih arterija zdravih ispitanika, dok se to gubi kod osoba oboljelih od hipertenzije i/ili dijabetesa tipa 2 (93). Osobe koje imaju poremećenu toleranciju glukoze te one koje u obitelji imaju osobe oboljele od dijabetesa melitusa imaju povećani rizik od nastanka dijabetesa melitusa tipa 2 (94). Cabalero i suradnici (95) dokazali su da takve osobe imaju oštećenu vaskularnu reaktivnost, odnosno smanjeni vazodilatacijski odgovor na acetilkolin i natrij-nitroprusid. Osobe oboljele od dijabetesa melitusa tipa 1 imaju niže vrijednosti protokom potaknute vazodilatacije brahijalne arterije te povećanu debljinu intime tih arterija u odnosu na kontrolne zdrave ispitanike (96). Mjerenje krvnog protoka *lasser dopplerom* nakon stimulacije acetilkolinom i natrij-nitroprusidom pokazuje znatno smanjenje protoka kroz kožu u dijabetičkih bolesnika u usporedbi sa zdravim ispitanicima (97).

Kombinacija poremećaja dijabetesa melitusa i hiperkolesterolemije uzrokuje poremećenu vaskularnu reaktivnost preko NO-cGMP puta te postoji tendencija da kompenzatorno povećavaju utjecaj EDHF vazodilatacije u aorti štakora (98).

1.9. Terapija hiperbaričnim kisikom

Hiperbarična oksigenoterapija (HBOT) medicinski je tretman pri čemu je pacijent smješten u tlačnu komoru, gdje udiše 100-postotni kisik pri tlaku većem od 1 atmosfere (99). Udisanjem hiperbaričnog kisika u krvi se otapa i do 20 puta više kisika nego udisanjem zraka (normalno disanje) ili tri do četiri puta više nego udisanjem kisika pri normalnom tlaku. Doprema kisika pod visokim tlakom povećava arterijski i tkivni pO_2 i zato poboljšava oksigenaciju tkiva i smanjuje oštećenja. Nove studije pokazuju da HBOT pridonosi cijeljenju ishemičnih ulceracija kod dijabetičkih bolesnika te poboljšava ishod nakon moždanog udara (100), infarkta miokarda (101), akutne periferne ishemije ekstremiteta kod ljudi (102) te smanjuje aterosklerotske plakove u animalnim modelima (30). Iako su ovi povoljni učinci HBOT-a dokumentirani, još uvijek nisu u cijelosti poznati mehanizmi kojima se to zbiva. Naime, poznato je da su različiti metaboliti arahidonske kiseline (prostaglandini, EETs-i, HETEs-i) te NO iznimno važni u posredovanju vaskularnih reakcija na vazodilatatore i vazokonstriktore u različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima kao npr. u DM-u (53, 55, 56, 57, 82.), uključujući podražaje hipoksijom i hiperoksijom (103). U uvjetima smanjenog krvnog protoka, primjena HBOT-a može znatno povećati tkivnu oksigenaciju. Karadurmus i suradnici (104) dokazali su pozitivan učinak HBOT-a na kontrolu ateroskleroze, glikemije i upalnih medijatora kod dijabetičkih pacijenata. Glukoza i hemoglobin A_{1C} znatno su smanjeni, visokoosjetljivi C reaktivni protein, lipoprotein male gustoće (LDL) i mokraćna kiselina također su znatno smanjeni, a lipoprotein velike gustoće (HDL) nakon HBOT-a bitno je povećan. Kessler i suradnici (105) dokazali su da se transkutani tlak kisika znatno povećava poslije HBOT-a oko dijabetičnog ulkusa, u međurebranom prostoru, te da se veličina ulkusa značajno smanjila nakon HBOT-a. Združenom terapijom α -lipoičnom kiselinom i HBOT-om dolazi do značajnog poboljšanja cijeljenja kroničnih rana na bazi povećane ekspresije matriks metaloproteinaze i povećane angiogeneze (106).

2. HIPOTEZA

Hipoteza predložene doktorske disertacije je da je kod štakorica s dijabetesom melitusom izazvanim streptozocinom, smanjena relaksacija aortnih prstenova u odgovoru na acetilkolin, koja se popravljala nakon izlaganja životinja HBOT-u.

Druga hipoteza je da akutni tretman izoliranih aortnih prstenova s inhibitorom stvaranja 20-HETE (HET0016) *in vitro*, poboljšava vaskularnu relaksaciju na acetilkolin u ženki dijabetičkih štakora. Smanjena relaksacija u odgovoru na acetilkolin kod dijabetičkih štakora može biti posljedica povećane proizvodnje ili povećane osjetljivosti na vazokonstriktorne metabolite ciklooksigenaze (poput tromboksana A₂) ili metabolite CYP 450- ω hidroksilaze (poput 20-HETE).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj je predložene doktorske disertacije utvrditi utjecaj HBOT-a na funkciju krvnih žila te identificirati specifične mehanizme kojima HBOT utječe na relaksaciju aortnih prstenova potaknutu acetilkolinom kod zdravih i dijabetičkih štakorica.

Dodatni cilj je rasvijetliti ulogu 20-HETE u makrovaskularnoj reaktivnosti ovisnoj o endotelu kod ženki dijabetičkih štakora.

4. MATERIJALI I METODE

Eksperimentalna studija na animalnom modelu dijabetesa melitusa tipa 1 izazvanog streptozotocinom (Sprague-Dawley štakorice).

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije Medicinskog fakulteta u Osijeku. U ovoj studiji koristio sam Sprague-Dawley (SD) štakorice u dobi od 12 tjedana starosti u vrijeme pokusa, uz trajanje dijabetesa od 6 tjedana. Svi su štakori iz vlastitog uzgoja vivarija pri Medicinskom fakultetu u Osijeku. Za animalni model šećerne bolesti tipa I koristio sam streptozocin u jednoj dozi od 60 mg/kg kako je opisano u prijašnjim radovima (107). Streptozocin je lijek koji je otkriven 50-tih godina dvadesetog stoljeća te je u početku korišten kao antibiotik (108). 60-tih je godina otkrivena njegova selektivna toksičnost za β -stanice Langerhansovih otočića te se otada koristi kao kemoterapeutik za metastatski karcinom β -stanica Langerhansovih otočića, koji nisu podložni operativnom zahvatu (109), te u istraživanjima kao što je animalni model dijabetesa melitusa tipa 1 (107, 110).

Životinje su bile podijeljene u četiri skupine: skupina 1 (CTR) – zdrave netretirane štakorice, skupina 2 (DM) – štakorice kojima je izazvan dijabetes melitus tipa I pomoću streptozocina (streptozocin, minimalno 98 % HPLC 1 g, Sigma-Aldrich), skupina 3 (DM + HBOT) – štakorice sa streptozocinskim DM-om izložene djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori (rekompresijska komora za eksperimente 110 l, Đuro Đaković, Aparati d.d.), skupina 4 (CTR + HBOT) – zdrave štakorice izložene djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori. Dodatno su bile uključene dvije skupine štakorica: jedna skupina u kojoj su bile ovarijektomirane štakorice bez dijabetesa (CTR + OVX) te skupina u kojoj su bile ovarijektomirane dijabetičke štakorice (DM + OVX).

HBOT tretman provodio se pod tlakom od 2 atm u trajanju od 120 minuta tijekom četiri uzastopna dana, a peti se dan određivala sposobnost relaksacije aortalnih prstenova na acetilkolin. Vaskularni odgovor na kumulativne koncentracije acetilkolina (10^{-10} – 10^{-5} M) u prekontrahiranim aortalnim prstenovima mjerio se s/bez inhibitora ciklooksigenaze (indometacin), inhibitora dušik-oksida sintaze – N omega-Nitro-L-arginin metil ester hidroklorid (L-NAME), selektivnog inhibitora CYP450-epoksigenaze – N-Metilsulfonil-6-(2-propargiloksifenil)heksanamida; N-(Metilsulfonil)-2-(2-propin-1-iloksi)benzeneheksanamid (MS-PPOH) te selektivnog inhibitora CYP450- ω hidroksilaze – N-hidroksi-N'-(4-butil-2-metilfenil)-formamidin (HET0016). Odvojeno su se provodili pokusi s o endotelu-neovisnim donatorom NO natrij-nitroprusidom (SNP). Ukupno je upotrijebljeno 160 štakorica.

4.1. Priprema pokusnih skupina

CTR: skupina zdravih netretiranih štakorica koja je neprestano boravila u nastambi.

DM: skupina koja je sa 6 tjedana starosti primila streptozocin u dozi od 60 mg/kg otopljen u 0,5 ml fiziološke otopine i čije su štakorice nakon 6 tjedana trajanja dijabetesa eutanazirane te su im uzete krvne žile i ostali uzorci za pokus.

DM + HBOT: skupina koja je, također, primila streptozocin sa 6 tjedana starosti, a nakon 6 tjedana trajanja šećerne bolesti bila izložena hiperbaričnom kisiku u barokomori dva sata na 2,0 atm, uzastopno četiri dana. Peti su dan od izlaganja životinje usmrćene, uzeti su im uzorci i provedena funkcionalna ispitivanja reaktivnosti krvnih žila.

CTR + HBOT: četvrta je skupina s 12 tjedana bila izložena hiperbaričnom kisiku u barokomori dva sata na 2,0 atmm, uzastopno četiri dana. Peti su dan štakorice usmrćene za uzorkovanje i provođenje funkcionalnih studija vaskularne reaktivnosti ili molekularnih analiza.

Sve su štakorice bile izvagane u 6. tjednu i prije žrtvovanja za pokus. Sve su skupine imale slobodan pristup hrani i vodi te uobičajeno kretanje.

CTR + OVX: ovarijska ovarijska bilateralnim ventralnim pristupom (OVX štakori) učinjena je u dobi od 5 tjedana prema metodi koju je opisao Khajuria (111). Prije operacije životinje su anestetizirane kombinacijom ketamina (75 mg/kg) i midazolama (0,5 mg/kg). Jajovodi su podvezani svilenim koncem (Syneture, SOFSILK 3-0, Tyco Healthcare Ltd., UK). Peritoneum i mišićni slojevi zašiveni su apsorbirajućim šavom (Syneture, POLYSORB 3-0, Tyco Healthcare Ltd., UK), a koža neresorptivnim šavom (SOFSILK 3-0, Tyco Healthcare Ltd., UK). Nakon operacije štakori su smješteni pojedinačno u kaveze da se oporave tijekom jednog tjedna. Natrij-metamizol (1,5 ml/100 g i.m.) korišten je za postoperativnu analgeziju (112).

DM + OVX: ovarijske ovarijske su provedene kao i kod prethodne skupine u 5. tjednu života, a sa 6 tjedana života štakoricama je izazvan DM kao i u prethodnim skupinama s DM-om.

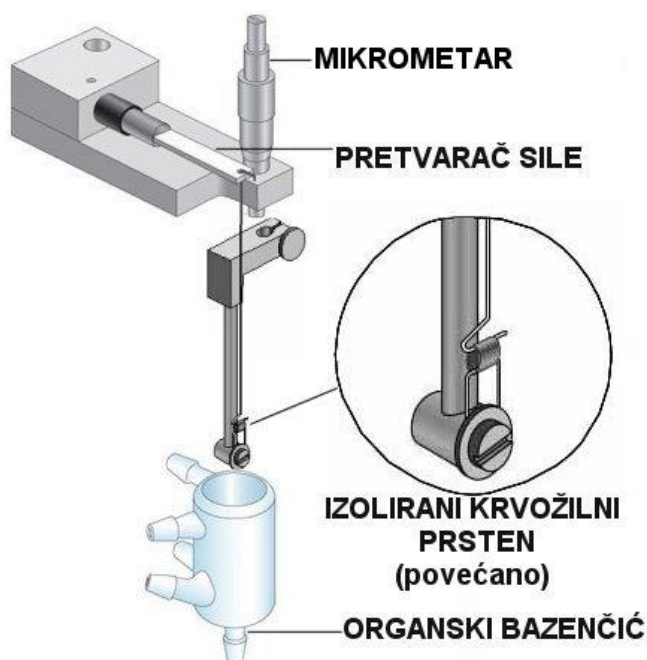
4.2. Protokoli za izlaganje hiperbaričnom kisiku

Nakon smještanja životinja u barokomoru slijedi 15 minuta kompresije na 2,0 atm, otvaranjem kompresijskog ventila (dekompresijski je ventil pri tome zatvoren) i puštanjem kisika u komoru. Kada se postigne tlak od 2,0 atm, kompresijski se ventil zatvori te su štakori izloženi djelovanju 100-postotnog kisika u trajanju od dva sata u zatvorenom sustavu bez protoka. Za

vrijeme trajanja terapije zajedno sa štakorima u komori je smještena i malena količina granula kalcij-hidroksida i natrij-hidroksida te etilvioleta (Draegorsorb 800 Plus, Draeger Medical) za upijanje izdahnutog CO₂ te se tako uklanja nakupljanje CO₂ u komori. Slijedi 15 minuta dekompresije otpuštanjem dekompresijskog ventila (113).

4.3. *In vitro* izolirane perfundirane torakoabdominalne aorte

Pri izvođenju pokusa radio sam nekoliko protokola. Svaki protokol započinje izolacijom torakoabdominalne aorte. Na početku sam izvagao svaku štakoricu, zatim sam ih anestezirao kombinacijom ketamina od 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule od 2 ml, Pfizer) i midazolama od 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma). Nakon dekapitacije glukometrom sam izmjerio glukozu u krvi (One Touch Ultra, Life Scan, Inc.). Nakon toga sam izvadio torakoabdominalnu aortu, očistio ju od masnog i vezivnog tkiva, isjekao na prstenove širine 3 mm i montirao na izometričke pretvarače sile (Isolated Organ Bath System, Experimentaria Ltd., Budimpešta, Mađarska). Pretvarač sile spojen je na pojačalo i na analogno/digitalni pretvarač, gdje sam pratio grafički prikaz tijeka pokusa na zaslonu računala (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Shema sustava za izolirane aortne prstenove – nacrtano prema ilustraciji (111)

Relaksaciju ili kontrakciju aortnog prstena mjerio sam pomoću softvera SOFT-03 KYMO S.P.E.L. solution pack for experimental laboratories-ADVANCE KYMOGRAPH. Žile su bile perfundirane i uronjene u toplu (37 °C) Krebs-Hansenleitovu otopinu, pH vrijednost iznosila je 7,45 te su oksigenirane 95 % O₂ i 5 % CO₂ (114).

4.4. Eksperimentalni protokoli za utvrđivanje mehanizama vaskularne reaktivnosti

4.4.1. Prvi protokol

U svrhu utvrđivanja vazodilacijskog odgovora ovisnog o endotelu; stabilizacija krvne žile u trajanju od 1 sata, svakih 15 minuta mijenjao sam Krebs-Hansenleitovu otopinu u komorici. Nakon stabilizacije dodao sam 3 x 200 µL 3 M KCl (kalijevog klorida), čekao do platoa kontrakcije, a zatim 2 x isprao komoricu u razmaku od 2 minute. Nakon trećeg dodavanja KCl i postizanja platoa, komoricu sam isprao 3 puta u razmaku od 2 minute. Nakon 10 minuta od zadnjeg ispiranja dodao sam noradrenalin 100 µL 10⁻⁶ M za prekontrakciju (pričeka 5 minuta do vrhunca i stabilizacije kontrakcije), a zatim dodao kumulativne doze ACh u koncentraciji 10⁻⁸ – 10⁻⁴ M u razmaku od 2 minute.

4.4.2. Drugi protokol

Postupak iz prvog protokola ponovio sam nakon 20 minuta inkubacije aortnih prstenova u tekućini iz komorice, u koju je dodano 100 µL 10⁻⁴ M indometacina, neselektivnog blokatora enzima ciklooksigenaze (Indomethacin, minimalno 99 % TLC, 5 g, Sigma-Aldrich).

4.4.3. Treći protokol

Radi utvrđivanja uloge citokroma P 450-epoksigenaze, vaskularna reaktivnost na ACh ispitivala se u prisutnosti inhibitora epoksigenacije MS-PPOH (100 µL 10⁻⁴ M).

4.4.4. Četvrti protokol

Ulogu NO u posredovanju vazodilacije na acetilkolin analizirao sam s i bez inhibicije eNOS s L-NAME (150 µL 10⁻³ M).

4.4.5. Peti protokol

Ulogu 20-HETE u makrovaskularnoj reaktivnosti ispitivao sam primjenom njezina inhibitora CYP450- ω hidroksilaze- HET0016 100 µL (10⁻⁴ M).

4.5. Određivanje mRNA

U svrhu utvrđivanja utjecaja HBOT-a na izražajnost enzima koji stvaraju metabolite odgovorne za vaskularnu reaktivnost u odgovoru na ACh, određivao sam mRNA za eNOS, iNOS, CYP450- ω hidroksilazu (izoforme), COX_{1,2}, TXA₂ sintazu i PGI₂ sintazu te vaskularne izoforme CYP450 epoksigenaze u svih 4 – 6 skupina štakorica. Uzorak aorte stavljao se u reagens RNeasy (Qiagen, Njemačka) te su se tako spremljeni uzorci čuvali pri temperaturi od -80 °C do izolacije RNA. Izolacija RNA iz tkivnog homogenata napravljena je prema protokolu Chomczynski i Sacchi (115), metodom izolacije Trizolom. Izolirana i otopljena RNA pohranjena je pri temperaturi od -80 °C. Reverzna transkripcija postupak je kojim se iz mRNA dobiva komplementarna molekula DNA (cDNA), a nakon prethodnog pročišćavanja RNA kompleksom Deoxyribonuclease I (Sigma, SAD) s ciljem odvajanja genomske DNA i praćenja ekspresije čiste RNA. Za određivanje relativne ekspresije RNA za eNOS, iNOS, CYP450- ω hidroksilazu (izoforme), COX_{1,2}, TXA₂ sintazu i PGI₂ sintazu te vaskularne izoforme CYP450 epoksigenaze koristio sam CFX96 Real-Time System C 1000 Touch Thermal Cycler, BIO-RAD, SAD. Uvjeti PCR reakcije prema protokolu SsoFast EvaGreen Supermix (Bio Rad, SAD). Dobivena relativna ekspresija željenog gena normalizirala se s relativnom ekspresijom referentnog gena (18s i HPRT) i dalje se analizirala.

Tablica 4.1. Sljedovi prilagođenih početnica za određivanje ekspresije mRNA.

mRNA	Sljedovi prilagođenih početnica	PCR duljina proizvoda (bp)	Temperatura žarenja (°C)
HPRT	Za -5'- GAAAGAACGTCTTGATTGTTGAAGATAT-3' Rev - 5'-GAGAGGTCCTTTTCACCAGCAA-3'	129	59
COX1	Za - 5'-TCCTGTTCCGAGCCCAGTT-3` Rev-5`-GCCAGTGATAGAGGTGGTTGAAT-3`	69	61
COX2	Za - 5`GAAAGAAATGGCTGCAGAGTTGA 3` Rev. 5 "GCAGGGCGGGATACAGTTC 3`	71	63
TBXAS1	Za - 5'-CTGAGGAAGTTGGGCATCAGA-3' Rev - 5'-CCTGGCGGAAAAACATCAA-3'	70	57
eNOS	Za - 5`-CGAACAGCAGGAGCTAGAGG-3`	211	64

	Rev-5`-GAGGTGGATCTCTCCTGGGT-3`		
iNOS	Za - 5`-TGGTGAGGGGACTGGACTTT-3` Rev - 5`-CCAACTCTGCTGTTCTCCGT-3`	101	63
CYP2J3	Za - 5'-CCTTTCTGTTCCTGGCTGATTT-3' Rev - 5'- AGGCCCTGGCGGGTAGT-3'	62	60
CYP4A1	Za - 5'-GTTCTACCTGCAAAGGCAATGG-3' Rev - 5'-TGCCCAAAGAACCAGTGGAA-3'	78	60
CYP4A3	Za - 5'-TCTCAGGGAGCAAAACACGA- 3' Rev - 5'-CAACAGGAGCAAACCATAACCA-3 '	134	59

eNOS – endotelna sintetaza dušikovog oksida; **iNOS** – inducibilna sintetaza dušikovog oksida; **COX-1** – ciklooksigenaza 1; **COX-2** – ciklooksigenaza 2; **TBXAS1** – tromboksan A sintetaza 1; **CYP2J3** – citokrom P450 2J3; **CYP4A1** – citokrom P450 4A1; **CYP4A3** – citokrom P450 4A3; **HPRT**- guanin phosphoribozil transferaza.

4.6. Mjerenje oksidativnog stresa

Uzorci krvi za mjerenje oksidativnog stresa prikupljeni su odmah nakon dekapitacije, centrifugirani su na 3500 o/min i pohranjeni na -80 °C do uporabe. Za mjerenja oksidacijskog stresa korištena je metoda spektrofotometrijske reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS) koja mjeri produkte lipidne peroksidacije iz uzoraka seruma. Budući da metoda nije specifična jer se druge tvari vežu na TBA (uključujući proteine), u uzorak je dodana trikloroetena kiselina (TCA) kako bi se proteini precipitirali, a nakon toga je za mjerenje korišten supernatant (116, 117). Apsorbancija uzorka mjerena je na nanofotometru P300 UV/Vis, IMPLEN na 572 i 532 nm s malondialdehidom (MDA) kao standardom (uM MDA).

Reagensi

NA, ACh, L-NAME i indometacin kupljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich. Ketamin i midazolam dobiveni su od tvrtke Pfizer. Streptozocin je nabavljen od tvrtke Sigma-Aldrich. Krebs-Henseleitova otopina (sastav: 113 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄ × 7H₂O, 22 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 11 mM glukoza, 2,5 mM CaCl₂ × 2H₂O, 0,026 mM etilendiamintetraoctena kiselina – EDTA) pripravljena je iz EDTA i nabavljena od tvrtke

Sigma-Aldrich; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i NaHCO_3 iz tvrtke Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka, s ostatkom kemikalija kupljenih od Kemika, Zagreb, Hrvatska. MS-PPOH i HET0016 bili su pokolon Johna R. Falcka iz ustanove Southwestern Medical Center, Dallas, Teksas, SAD. Kemikalije korištene za određivanje oksidativnog stresa bile su tiobarbiturna kiselina (TBA; Sigma-Aldrich, Njemačka, SAD), trikloroctena kiselina (TCA, Panreac, Europa) i 1,1,3,3-tetrametoksipropen (TMP, Sigma-Aldrich).

4.7. Statističke metode

Svi podaci sumirani su kao standardna pogreška aritmetičke sredine \pm SEM (prema engl. *Standard Error of the Mean*). Dvosmjerna ANOVA i Bonferroni *post hoc* testovi korišteni su za ispitivanje razlika u ACh-induciranoj relaksaciji među skupinama. Vrijednosti ACh polovine maksimalne učinkovite koncentracije (LogEC_{50}) uspoređene su studentovim t-testovima ili jednosmjernim ANOVA testovima kada je bilo prikladno. Jednosmjerni ANOVA i Tukey *post hoc* testovi korišteni su za ispitivanje razlike u tjelesnoj težini, razini glukoze u krvi, razini oksidativnog stresa i ekspresiji gena među skupinama. Vjerojatnost $P \leq 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Za statističku analizu korišten je SigmaPlot, inačica 11.2 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, SAD), a GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD) korišten je za grafički prikaz dobivenih rezultata.

5. REZULTATI

5.1. Uloga 20-HETE u makrovaskularnoj reaktivnosti ovisnoj o endotelu kod ženki dijabetičkih štakora

Tjelesna masa, razina glukoze u krvi i oksidativni stres eksperimentalnih životinja (u dobi od 12 tjedana)

Tjelesna masa, razina glukoze u krvi i oksidativni stres svih eksperimentalnih životinja prikazani su u Tablici 5.1. Dijabetičke štakorice (DM) imale su manju tjelesnu masu u usporedbi s kontrolama (CTR), što se očekivalo zbog neliječenog DM-a. Također, dijabetičke štakorice koje su podvrgnute liječenju HBOT-om (DM + HBOT) imale su manju tjelesnu masu u usporedbi sa zdravim kontrolama koje su podvrgnute HBOT-u (CTR + HBOT). Štakorice s dijabetesom koje su podvrgnute HBOT-u (DM + HBOT) imale su veću tjelesnu masu u usporedbi s DM štakoricama (Tablica 5.1.). Kao što se očekivalo, razina glukoze u krvi značajno je povećana u DM i DM + HBOT štakorica u usporedbi s njihovim odgovarajućim kontrolama, što je potvrdilo uspješan razvoj modela dijabetesa tipa 1 u našem eksperimentalnom protokolu (Tablica 5.1.). DM štakorice povećale su TBARS u usporedbi s CTR štakoricama (Tablica 5.1.). Također, TBARS je značajno povećan u DM + HBOT štakorica u usporedbi s CTR + HBOT štakoricama (Tablica 5.1.). Dodatno, DM + HBOT štakorice značajno su povećale TBARS u usporedbi s CTR skupinom štakorica. Nije bilo značajne razlike u antioksidativnom kapacitetu plazme FRAP-u (prema engl. *Ferric Reducing Ability of Plasma*) među pokusnim skupinama štakorica (Tablica 5.1.).

Tablica 5.1. Tjelesna masa, glukoza u krvi i razina oksidativnog stresa štakorica u dobi od 12 tjedana.

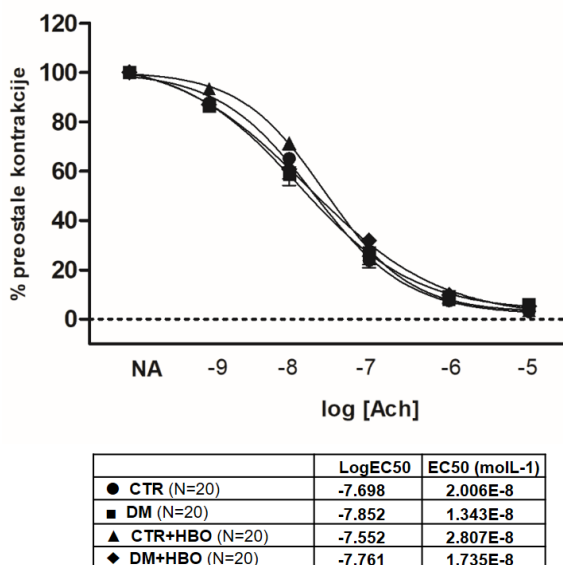
Ispitivane skupine*	Aritmetička sredina (standardna pogreška)			
	CTR (n =10)	DM (n =10)	CTR + HBO (n =10)	DM + HBO (n =10)
Obilježja [†]				
Tjelesna masa, g	237 ± 6	179 ± 14 *	240 ± 5	209 ± 5 †
Glukoza u krvi, mmol/L	6,5 ± 0,2	32,5 ± 0,5 *	7,2 ± 0,2	28,7 ± 0,9

TBARS, $\mu\text{mol MDA}$	$0,52 \pm 0,15$	$1,10 \pm 0,05^*$	$1,09 \pm 0,17$	$\S 1,22 \pm 0,02$
FRAP, mM Trolox	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$

***CTR** – zdrave netretirane štakorice; **DM** – štakorice s dijabetesom; **CTR + HBO** – zdrave štakorice izložene hiperbaričnom kisiku; **DM + HBO** – štakorice s dijabetesom izložene hiperbaričnom kisiku; [†]**TBARS** – reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline; **FRAP** – antioksidativni kapacitet plazme; **n**– broj štakorica; \pm **SEM**– standardna pogreška aritmetičke sredine .

Mehanizmi acetilkolinom inducirane relaksacije (AChIR) izoliranih aortnih prstenova štakorica

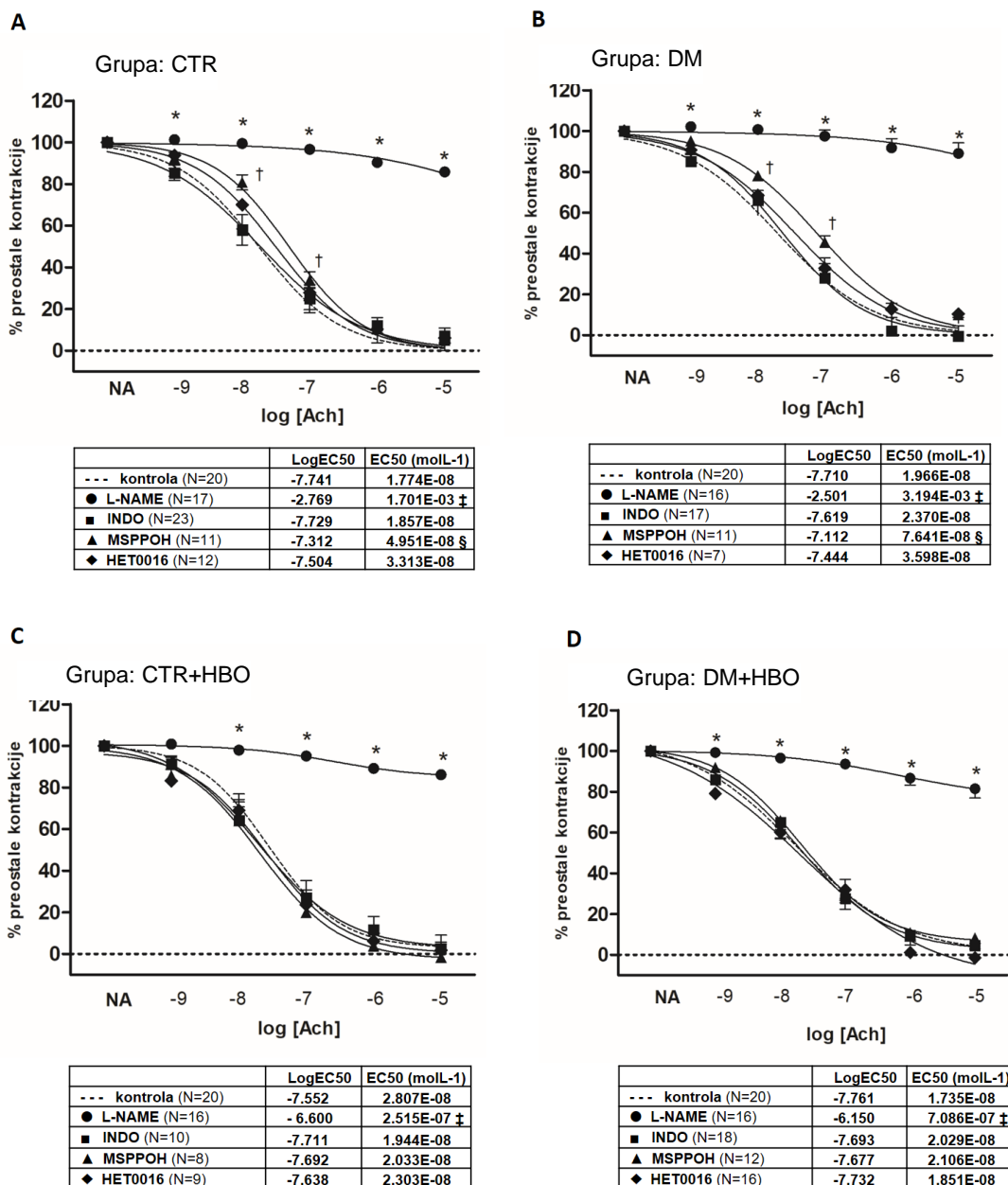
Slika 5.1. prikazuje osnovnu AChIR izoliranih aortnih prstenova štakorica u svim eksperimentalnim skupinama SD štakorica. Među skupinama nije bilo značajnih razlika u veličini AChIR izoliranih aortnih prstenova štakorica. Također, polovična maksimalna učinkovita koncentracija ACh (LogEC₅₀) (osjetljivost na ACh) nije se značajno razlikovala u eksperimentalnim skupinama štakorica (tablica na Slici 5.1.).



Slika 5.1. ACh inducirana relaksacija (AChIR) izoliranih aortnih prstenova štakorica u CTR, DM, CTR + HBOT i DM + HBOT skupini štakorica.

Nije bilo značajne razlike u AChIR-u u eksperimentalnim skupinama štakorica. Nije bilo razlike u osjetljivosti na ACh među skupinama (tablica na slici). Vrijednosti LogEC₅₀ (prikazane u odgovarajućim tablicama) uspoređene su pomoću jednosmjernog ANOVA testa.

ACh koncentracija 10^{-9} do 10^{-5} M. N – broj aortnih prstenova. EC₅₀ (molL⁻¹) – polovica maksimalno učinkovite koncentracije predstavlja koncentraciju ACh (molL⁻¹) koja inducira odgovor na pola puta između osnovne linije i maksimuma.



Slika 5.2. Mehanizmi acetilkolinom (AChIR) inducirane relaksacije izoliranih aortnih prstenova štakorica u CTR (panel A), DM (panel B), CTR + HBOT (panel C) i DM + HBOT skupini štakorica (panel D).

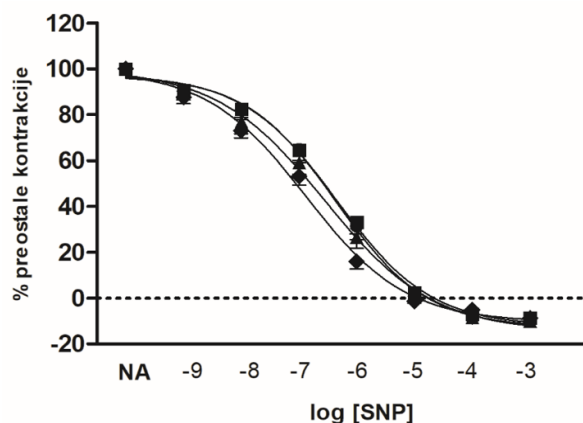
Potencijalni mehanizmi koji posreduju AChIR odgovor izoliranih aortnih prstenova štakorica u pokusnim skupinama štakorica prikazani su na Slici 5.2. U CTR skupini prisutnost L-NAME i MS-PPOH znatno je smanjila AChIR, dok primjena INDO (COX-1 i -2 inhibitor) i HET0016

(inhibitor formiranja 20-HETE) nisu imali nikakav značajan učinak na AChIR u CTR skupini štakorica (Slika 5.2., panel A). Slični rezultati dobiveni su u DM skupini štakorica (Slika 5.2., panel B). I u CTR i DM skupini štakorica analiza osjetljivosti aortnog prstena na ACh pokazala je da je osjetljivost na ACh u prisutnosti L-NAME i u prisutnosti MSPPOH znatno smanjena u usporedbi s odgovorom na ACh, sam ili u prisutnosti indometacina ili HET0016 (tablice unutar panela 2A i 2B). U CTR + HBOT i DM + HBOT skupini samo prisutnost L-NAME, ali ne i MS-PPOH, INDO ili HET0016, značajno je smanjila AChIR (Slika 5.2., panel C i panel D). Nadalje, u skupinama CTR + HBOT i DM + HBOT osjetljivost na ACh bila je značajno niža u prisutnosti L-NAME u usporedbi s osnovnim odgovorom ili odgovorom na ACh u prisutnosti indometacina, MS-PPOH ili HET0016 (Slika 5.2., tablice unutar panela 2C i panela 2D).

Prisutnost L-NAME i MS-PPOH značajno je reducirala AChIR izoliranih aortnih prstenova štakorica u CTR skupini (panel A) i DM skupini štakorica (panel B). Primjena indometacina i HET0016 nije imala nikakav značajan učinak na AChIR u bilo kojoj skupini, dok primjena MS-PPOH nije imala nikakav značajan učinak na AChIR u CTR + HBOT (panel C) i DM + HBOT skupini štakorica (panel D). Podaci su uspoređeni pomoću dvosmjernih ANOVA i Bonferroni *post hoc* testova. Osjetljivost na ACh u prisutnosti L-NAME i MS-PPOH bila je značajno smanjena u usporedbi s odgovorom samo na ACh ili u prisutnosti indometacina ili HET0016 u skupini CTR i DM štakorica (tablice unutar panela A i panela B). Osjetljivost na ACh u prisutnosti L-NAME bila je značajno smanjena u usporedbi s odgovorom na ACh, sam ili u prisutnosti drugih inhibitora u CTR + HBOT i DM + HBOT skupini štakorica (tablice unutar panela C i panela D). Vrijednosti LogEC50 uspoređene su pomoću jednosmjerne ANOVE, nakon čega je uslijedila Holm-Sidak parna višestruka usporedba. Statistički značajna ($P < 0,05$) AChIR u prisutnosti L-NAME (*) ili MS-PPOH (†) u usporedbi s osnovnim odgovorom ACh. ‡ $P < 0,05$ L-NAME nasuprot osnovnom odgovoru, indometacin i MS-PPOH; § MS-PPOH u odnosu na osnovnu vrijednost i indometacin. N – broj aortnih prstenova. EC50 (molL⁻¹) – polovica maksimalno učinkovite koncentracije predstavlja koncentraciju ACh (molL⁻¹) koja inducira odgovor na pola puta između osnovne linije i maksimuma.

Narij nitroprusidom (SNPIR) inducirana relaksacija izoliranih aortnih prstenova štakorica

Slika 5.3. prikazuje relaksaciju aortnih prstenova kao odgovor na SNP (SNPIR), endotel neovisni donor NO u svim eksperimentalnim skupinama SD štakorica. Nije bilo značajnih razlika u SNPIR-u među skupinama. Također, osjetljivost na SNP nije se značajno razlikovala među pokusnim skupinama štakorica (tablica na Slici 5.3).



	LogEC50	EC50 (molL ⁻¹)
● CTR (N=9)	-6.357	4.391E-7
■ DM (N=18)	-6.558	2.764E-7
▲ CTR+HBO (N=11)	-6.346	4.505E-7
◆ DM+HBO (N=16)	-6.884	1.307E-7

Slika 5.3. SNP inducirana relaksacija (SNPIR) izoliranih aortnih prstenova štakorica u CTR, DM, CTR + HBOT i DM + HBOT skupini štakorica. Nije bilo značajne razlike u SNPIR-u među eksperimentalnim skupinama štakorica. Također, nije bilo razlike u osjetljivosti na SNP među eksperimentalnim skupinama štakorica (tablica unutar slike). Vrijednosti LogEC50 (prikazane u odgovarajućim tablicama) uspoređene su pomoću jednosmjernog ANOVA testa. SNP koncentracija 10^{-9} do 10^{-3} M. N – broj aortnih prstenova. EC50 (molL⁻¹) – polovična maksimalna učinkovita koncentracija predstavlja koncentraciju SNP (M) koja inducira odgovor na pola puta između osnovne linije i maksimuma.

mRNA ekspresija enzima koji kataliziraju vazoaktivne medijatore u aorti štakorica

mRNA ekspresija za iNOS u tkivu aorte štakorica značajno je povećana u DM skupini u usporedbi s CTR skupinom štakorica (Tablica 5.2.). mRNA ekspresija za eNOS značajno je povećana u CTR + HBOT skupini u usporedbi s CTR skupinom štakorica, dok je mRNA ekspresija za TBXAS1 značajno povećana u DM + HBOT skupini u usporedbi s DM skupinom štakorica (Tablica 5.2.). Ekspresija za COX-1, COX-2, CYP2J3, CYP4A1 i CYP4A3 u torakalnoj aorti nije se značajno razlikovala među skupinama (Tablica 5.2.).

Tablica 5.2. Relativna ekspresija mRNA za eNOS, iNOS, COX-1, COX-2, TBXAS1, CYP2J3, CYP4A1 i CYP4A3 u tkivu torakalne aorte.

Ispitivane skupine* Obilježja [†]	Aritmetička sredina (standardna pogreška)			
	CTR (n =5)	DM (n =5)	CTR + HBO (n =5)	DM + HBO (n =5)
eNOS	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,16 ± 0,02 §	0,17 ± 0,04
iNOS	1,0E-3 ± 0,3E-3	0,03 ± 0,02 *	2,0E-3 ± 1,0E-3	8,0E-3 ± 2,0E-3
COX-1	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,09 ± 0,02
COX-2	0,16 ± 0,06	0,12 ± 0,08	0,12 ± 0,04	0,09 ± 0,03
TBXAS1	1,12 ± 0,15	1,17 ± 0,11	1,23 ± 0,09	1,67 ± 0,11
CYP2J3	2,64 ± 0,30	1,93 ± 0,43	2,80 ± 0,23	1,75 ± 0,24
CYP4A1	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
CYP4A3	1,4E-6 ± 2,5E-7	0,8E-6 ± 2,8E-7	1,7E-6 ± 2,5E-7	1,0E-6 ± 1,9E-7

Podaci su prikazani kao standardna pogreška aritmetičke sredine ± SEM. **n** – broj štakora; ***CTR** – zdrave netretirane štakorice; **DM** – štakorice s dijabetesom; **CTR + HBO** – zdrave štakorice izložene hiperbaričnom kisiku; **DM + HBO** – štakorice s dijabetesom izložene hiperbaričnom kisiku [†]**eNOS** – endotelna sintetaza dušikovog oksida; **iNOS** –inducibilna sintetaza dušikovog oksida; **COX-1** – ciklooksigenaza 1; **COX-2** – ciklooksigenaza 2; **TBXAS1** – tromboksan A sintetaza 1; **CYP2J3** – citokrom P450 2J3; **CYP4A1** – citokrom P450 4A1; **CYP4A3** – citokrom P450 4A3.

* P < 0,05 CTR prema DM; ‡ P < 0,05 DM u odnosu na DM + HBO; § CTR u odnosu na CTR + HBO

5.2. Utjecaj HBOT-a na funkciju krvnih žila i specifične mehanizme kojima HBOT utječe na relaksaciju aortnih prstenova potaknutu acetilkolinom kod zdravih i dijabetičkih štakorica

Tjelesna masa, razina glukoze u krvi i oksidativni stres eksperimentalnih životinja (u dobi od 12 tjedana)

Štakorice s dijabetesom (u obje ne-OVX i OVX skupine) imale su manju tjelesnu masu u usporedbi s njihovim odgovarajućim kontrolama. OVX-CTR štakorice imale su značajno višu tjelesnu masu u usporedbi s ne-OVX-CTR, dok se tjelesna masa OVX-DM štakorica nije značajno razlikovala od one kod štakorica bez OVX-DM (Tablica 5.4.). Kao što se očekivalo, razina glukoze u krvi bila je značajno povećana u ne-OVX-DM i OVX-DM skupini u odnosu na njihove odgovarajuće kontrole, što je potvrdilo uspješan razvoj modela dijabetesa u našem eksperimentalnom protokolu. Nije bilo razlike u razini glukoze u krvi između ne-OVX-CTR i OVX-CTR, ili između ne-OVX-DM i OVX-DM skupina štakorica (Tablica 5.4.). Ovarijsktomirane štakorice te OVX-CTR i OVX-DM štakorice imale su povećan TBARS u usporedbi s odgovarajućim ne-OVX štakoricama (Tablica 5.4.). Također, TBARS je značajno povećan u ne-OVX-DM štakorica u usporedbi s ne-OVX-CTR štakoricama, dok u OVX-DM štakorica TBARS nije bio značajno različit u odnosu na OVX-CTR štakorice (Tablica 5.4.).

Tablica 5.3. Tjelesna masa, koncentracija glukoze i razina oksidativnog stresa u krvi eksperimentalnih životinja (u dobi od 12 tjedana).

Ispitivane skupine*	Aritmetička sredina (standardna pogreška)			
	CTR (n=10)	DM (n=10)	OVX – CTR (n=10)	OVX – DM (n=10)
Obilježja[†]				
Tjelesna masa, g	240 ± 6 †	183 ± 13 *	336 ± 5	208 ± 19 * †
Glukoza u krvi, mmol/L	6,6 ± 0,2	30,8 ± 1,7 *	6,3 ± 0,1	30,7 ± 1,4 *
TBARS, μmol MDA	0,4 ± 0,2 †	1,1 ± 0,1 *	1,7 ± 0,1	2,0 ± 0,2 †

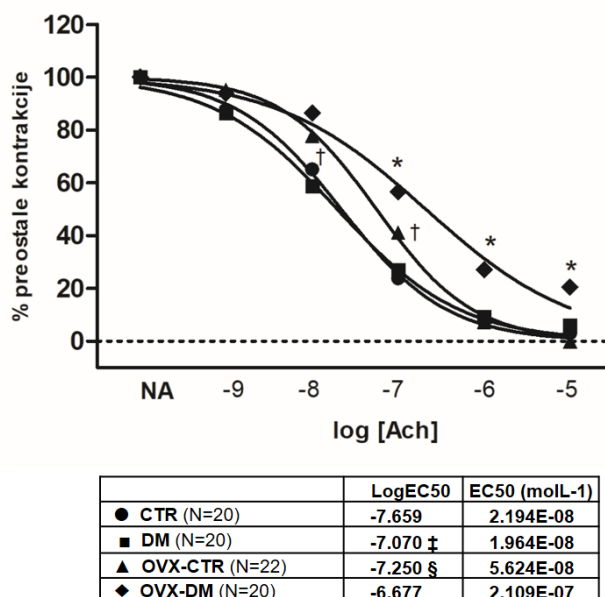
Podaci su izraženi kao standardna pogreška aritmetičke sredine ± SEM. *CTR – zdrave netretirane štakorice; DM – štakorice s dijabetesom; OVX – CTR– ovarijsktomirane netretirane štakorice; OVX–

DM– ovarijsktomirane štakorice s dijabetesom [†]**TBARS** – reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline (prema eng. *thiobarbituric acid reactive substances*); **MDA** – malondialdehid; **n** – broj štakorica.

* $P < 0,05$ CTR vs. DM i OVX-CTR vs. OVX-DM; [†] $P < 0,05$ CTR vs. OVX-CTR i DM vs. OVX-DM.

Acetilkolinom (AChIR) inducirana relaksacija izoliranih aortnih prstenova

Slika 5.4. prikazuje osnovnu AChIR izoliranih aortnih prstenova štakorica u svim eksperimentalnim skupinama SD štakorica. Iako nije bilo značajne razlike kod AChIR izoliranih aortnih prstenova štakorica između ne-OVX-CTR i ne-OVX-DM skupina štakorica (Slika 5.4.), OVX-DM skupina štakorica pokazala je značajno smanjenu relaksaciju izoliranih aortnih prstenova na ACh u odnosu na OVX-CTR skupinu (Slika 5.4.). OVX-CTR štakorice pokazale su smanjeni AChIR u usporedbi s ne-OVX-CTR štakoricama, a OVX-DM smanjila je AChIR u usporedbi s ne-OVX-DM štakoricama (Slika 5.4.). Nadalje, i ne-OVX-DM i OVX-DM štakorice pokazale su smanjenu osjetljivost na ACh u usporedbi s njihovim odgovarajućim kontrolama (tablice na Slici 5.4.). Također, osjetljivost na ACh bila je smanjena u OVX-CTR štakorica u usporedbi s ne-OVX kontrolama, baš kao što je to bio slučaj kod OVX-DM štakorica u usporedbi s ne-OVX-DM skupinom (tablice na Slici 5.4.).

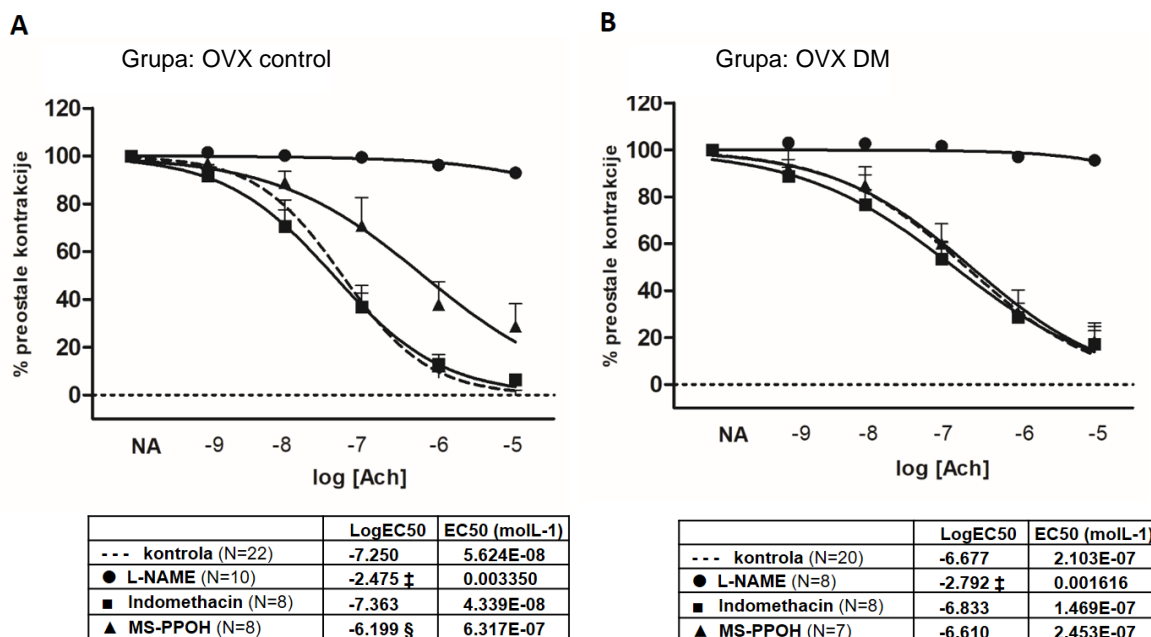


Slika 5.4. Osnovni AChIR izoliranih aortnih prstenova štakorica u svim eksperimentalnim skupinama SD štakorica. ACh inducirana relaksacija (AChIR) izoliranih aortnih prstenova štakorica u ne-OVX-CTR i ne-OVX-DM štakorica te OVX-CTR i OVX-DM štakorica. AChIR je značajno oslabljen u OVX-DM skupini u usporedbi s ne-OVX-DM skupinom štakorica za 10^{-7} – 10^{-5} M ACh koncentraciju. I ne-OVX-DM i OVX-DM štakorice pokazale su nižu

osjetljivost na ACh u usporedbi s njihovim odgovarajućim kontrolama (tablice unutar panela). AChIR je značajno smanjen u OVX-CTR skupini u usporedbi s ne-OVX-CTR skupinom (za 10^{-7} – 10^{-5} M ACh koncentraciju) i OVX-DM u usporedbi s ne-OVX-DM skupinom štakorica (za 10^{-7} – 10^{-5} M koncentracija ACh). Obje OVX-CTR i OVX-DM skupine štakorica pokazale su nižu osjetljivost na ACh u usporedbi s ne-OVX skupinama (tablice unutar panela). Vrijednosti LogEC50 (prikazane u odgovarajućim tablicama) uspoređene su studentovim t-testom. * $P < 0,05$ OVX-CTR u odnosu na OVX-DM, OVX-DM u odnosu na ne-OVX-DM. † $P < 0,05$ OVX-CTR u odnosu na ne-OVX-CTR. $P < 0,05$ ne-OVX-CTR u odnosu na ne-OVX-DM, OVX-DM u odnosu na ne-OVX-DM. $P < 0,05$ OVX-CTR u odnosu na OVX-DM, OVX-CTR u odnosu na ne-OVX-CTR. ACh koncentracija 10^{-9} do 10^{-5} mol $^{-1}$. N – broj aortnih prstenova. EC50 (molL $^{-1}$) – polovična maksimalna učinkovita koncentracija predstavlja koncentraciju ACh (molL $^{-1}$) koja inducira odgovor na pola puta između osnovne linije i maksimuma.

Mehanizmi koji posreduju AChIR odgovor izoliranih aortnih prstenova štakorica u eksperimentalnim skupinama štakorica prikazani su na Slici 5.5. U skupini ne-OVX-CTR štakorica, prisutnost L-NAME (eNOS inhibitora) i MS-PPOH (inhibitora EETs epoksidacije) značajno je smanjio AChIR, dok primjena indometacina nije imala značajne učinke na AChIR u skupini ne-OVX-CTR štakorica (Slika 5.5., panel A). Isti rezultati također su dobiveni u skupini ne-OVX-DM štakorica (Slika 5.5., panel B). Osjetljivost na ACh u prisutnosti L-NAME i MS-PPOH značajno je smanjena u usporedbi s osnovnim odgovorom na ACh ili odgovorom na ACh u prisutnosti indometacina, u skupinama ne-OVX-CTR i ne-OVX-DM štakorica (tablice u okviru panela A i B). U skupini OVX-CTR štakorica, prisutnost L-NAME i MS-PPOH značajno je reducirala AChIR izoliranih aortnih prstenova štakorica (Slika 5.5., panel A), kao što je to učinila u ne-OVX-CTR štakorica (Slika 5.5., panel A), dok primjena indometacina nije imala značajne učinke na AChIR u OVX-CTR skupini štakorica (Slika 5.5., panel A). S druge strane u OVX-DM skupini, prisutnost L-NAME, ali ne i MS-PPOH značajno je smanjila AChIR izoliranih aortnih prstenova štakorica (Slika 5.5., panel B). Također, primjena indometacina nije imala značajne učinke na AChIR u OVX-DM skupini štakorica (Slika 5.5., panel A). Osjetljivost na ACh u prisutnosti L-NAME i MS-PPOH značajno je smanjena u usporedbi s osnovnim odgovorom ili odgovorom na ACh u prisutnosti indometacina u OVX-CTR i OVX-DM skupinama štakorica (tablica unutar panela 3A), dok je u OVX-DM skupini osjetljivost na ACh u prisutnosti L-NAME značajno smanjena u usporedbi

s osnovnim odgovorom ili odgovorom na ACh u prisutnosti indometacina ili MS-PPOH (tablica unutar panela B).



Slika 5.5. Mehanizmi acetilkolinom induciraniog relaksacijskog odgovora (AChIR) izoliranih aortnih prstenova štakorica u OVX-CTR i OVX-DM štakorica. Paneli A i B prikazuju relaksaciju izoliranih aortnih prstenova na ACh (prikazano kao log [ACh] koncentracije ACh (10^{-9} do 10^{-5} M) u OVX-CTR (panel A) i OVX-DM skupini štakorica (panel B). Prisutnost L-NAME i MS-PPOH značajno je smanjila AChIR izoliranih aortnih prstenova štakorica u OVX-CTR skupini (panel A), a samo prisutnost L-NAME značajno je smanjila AChIR u OVX-DM skupini štakorica (panel B). Primjena indometacina nije imala značajne učinke na AChIR u OVX-CTR (panel A) i OVX-DM skupini štakorica (panel B). Podaci su uspoređeni pomoću dvosmjernih ANOVA i Bonferroni *post hoc* testova. Osjetljivost na ACh u prisutnosti L-NAME i MS-PPOH značajno je smanjena u usporedbi s osnovnim odgovorom ili odgovorom na ACh u prisutnosti indometacina u OVX-CTR, dok je u OVX-DM osjetljivost na ACh u prisutnosti L-NAME značajno smanjena u usporedbi s osnovnim odgovorom ili odgovorom na ACh u prisutnosti indometacina ili MS-PPOH. Vrijednosti LogEC50 uspoređene su pomoću jednosmjernog ANOVA testa, nakon čega je slijedila Holm-Sidac parna višestruka usporedba. Statistički značajna ($P < 0,05$) AChIR u prisutnosti L-NAME (*) ili MS-PPOH (†) u usporedbi s osnovnim odgovorom ACh. ‡ $P < 0,05$ L-NAME nasuprot osnovnoj liniji, indometacin i MS-PPOH; § MS-PPOH u odnosu na početnu vrijednost i indometacin. Koncentracije: ACh 10^{-9} do 10^{-5} M, L-NAME 3×10^{-4} M, indometacin 10^{-5} M i MS-PPOH 10^{-5} M. N – broj aortnih

prstenova. $EC_{50}(M)$ – polovična maksimalna učinkovita koncentracija predstavlja koncentraciju ACh (M) koja inducira odgovor na pola puta između osnovne linije i maksimuma.

Ekspresija mRNA enzima koji kataliziraju vazoaktivne medijatore u aortama štakorica

Ekspresija mRNA za iNOS u tkivu aorte štakorica značajno je povećana u ne-OVX-DM skupini štakorica u usporedbi s ne-OVX-CTR skupinom štakorica (Tablica 5.5.). Ekspresija mRNA za COX-2 u tkivu torakalne aorte značajno je smanjena, a ekspresija mRNA za TBXAS1 značajno je povećana u OVX-DM štakorica u usporedbi s OVX-CTR štakoricama (Tablica 5.5.). Ekspresija mRNA za CYP4A3 u tkivu torakalne aorte značajno je smanjena u OVX-DM štakorica u usporedbi s OVX-CTR štakoricama (Tablica 5.5.). Ekspresija za eNOS, COX-1, CYP2j3 i CYP4A1 u tkivu torakalne aorte nije se razlikovala između ne-OVX-CTR i ne-OVX-DM skupina niti između OVX-CTR i OVX-DM skupina štakorica (Tablica 5.5.).

Tablica 5.4. Relativna ekspresija mRNA za eNOS, iNOS, COX-1, COX-2, TBXAS1, CYP2J3, CYP4A1 i CYP4A3 u tkivu torakalne aorte.

Ispitivane skupine*	Aritmetička sredina (standardna pogreška)			
	CTR (n=5)	DM (n=5)	OVX – CTR (n=5)	OVX – DM (n=5)
Obilježja†				
eNOS	0,096 ± 0,014	0,150 ± 0,034	0,137 ± 0,019	0,122 ± 0,013
iNOS	0,001 ± 0,3E-3	0,026 ± 0,018 *	0,003 ± 0,002	0,004 ± 0,001
COX-1	0,134 ± 0,013	0,128 ± 0,041	0,094 ± 0,028	0,100 ± 0,007
COX-2	0,159 ± 0,062	0,124 ± 0,080	0,135 ± 0,073	0,624 ± 0,169 †
TBXAS1	1,115 ± 0,152	1,173 ± 0,111	1,288 ± 0,135	1,555 ± 0,118 †
CYP2J3	2,641 ± 0,297	1,932 ± 0,427	1,86 ± 0,178	1,949 ± 0,164
CYP4A1	0,0617 ± 0,017	0,053 ± 0,021	0,057 ± 0,020	0,029 ± 0,004
CYP4A3	1,4E-6 ± 2,5E-7	0,8E-6 ± 2,8E-7	2,9E-6 ± 4,2E-7	1,2E-6 ± 7,7E-7 †

Podaci su izraženi kao standardna pogreška aritmetičke sredine ± SEM. ***CTR** – zdrave netretirane štakorice; **DM** – štakorice s dijabetesom; **OVX-CTR** – ovarijektomirane netretirane štakorice; **OVX-DM** – ovarijektomirane štakorice s dijabetesom; †**eNOS** – endotelna sintaza dušikovog oksida; **iNOS** – inducibilna sintaza dušikovog oksida; **COX-1** – ciklooksigenaza 1; **COX-2** – ciklooksigenaza 2; **TBXAS1** – tromboksan-A sintaza 1; **CYP2J3** – citokrom P450 2J3; **CYP4A1** – citokrom P450 4A1; **CYP4A3** – citokrom P450 4A3; **n** – broj štakorica

* P < 0,05 CTR vs. DM. † P < 0,05 OVX-CTR vs. OVX-DM.

6. RASPRAVA

Brojni dokazi pokazuju da u bolesnika sa šećernom bolesti postoji visoki rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB) (npr. koronarna bolest srca, moždani udar, bolest perifernih arterija, kardiomiopatija, kongestivno zatajenje srca) te da su kardiovaskularne komplikacije sada vodeći uzroci morbiditeta i mortaliteta povezanih s dijabetesom (118). Dobro je utvrđeno da endotelna disfunkcija prati DM te se manifestira u obliku vaskularnih komplikacija koje su vidljive u makro- i mikrocirkulaciji (119). Ipak, iako su vaskularne promjene uobičajeno opisane kod pacijenata i eksperimentalnih životinja s dijabetesom, relaksacija ovisna o endotelu (procijenjena ACh-om induciranom vaskularnom relaksacijom izoliranih aortnih prstenova štakora) pokazala se netaknutom, oslabljenom ili čak pojačanom u eksperimentalnih životinja s dijabetesom (120, 121).

Učinci HBOT-a na mehanizme AChIR-a u štakorica s dijabetesom melitusom tipa 1

Istaknuto otkriće ove studije je da trajanja dijabetesa melitusa tipa 1 od 6 tjedana u ženskih SD štakora nije utjecalo na veličinu AChIR izoliranih aortnih prstenova, međutim, HBOT je utjecao na mehanizme AChIR-a. Nadalje, iako DM nije utjecao na AChIR kod ženki štakora, razina oksidativnog stresa bila je značajno povećana u obje, DM i DM + HBOT, skupine štakorica s dijabetesom u usporedbi s kontrolnim skupinama. Ovi rezultati ukazuju na vrlo rane promjene u oksidativnoj ravnoteži u DM-u, očito prije nego se može otkriti mjerljivo funkcionalno vaskularno oštećenje. Konačno, učinci HBOT-a na mehanizme AChIR-a nisu povezani s razinom oksidativnog stresa u bilo kojoj skupini ženki štakora. Povećani oksidativni stres podupire oslabljenu vaskularnu reaktivnost kod mnogih kardiometaboličkih bolesti, uključujući DM (122, 123, 124, 125, 126).

Međutim, u ovom istraživanju povećani oksidativni stres u skupini DM štakorica nije utjecao na mehanizme vaskularne relaksacije uzrokovane ACh-om (Tablica 5.2., Slika 5.1.). Naši rezultati pokazuju povišene razine TBARS-a u obje skupine dijabetičkih štakorica u usporedbi s njihovim kontrolama, dok intermitentni HBOT dodatno ne povećava razinu oksidativnog stresa, što je u skladu s našim prethodnim rezultatima (122, 127, 128). Poznato je da akutni HBOT može povećati proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i povećati TBARS (128, 129). Međutim, HBOT u intermitentnom protokolu kako je primijenjen, nije izazvao dodatni oksidativni stres, što je u skladu s prethodnim studijama (122, 127). Brojne neovisne studije o dijabetesu provedene na životinjama i ljudima izvijestile su o oštećenoj vaskularnoj funkciji u različitim vaskularnim ležištima i kalibrima krvnih žila u smislu povećane vaskularne reakcije

na vazokonstriktore i smanjenog odgovora na vazodilatatore (130, 131, 132). Primjerice, studija koju su proveli Bhwardai i suradnici pokazala je da je nakon 8 tjedana DM-a tipa 1, AChIR izoliranih aortnih prstenova smanjen, a što je praćeno smanjenjem aortalne i serumske koncentracije nitrita/nitrata i smanjenjem integriteta endotela aorte (133). Razine superoksida u aorti povećane su zajedno s povećanjem razina serumske peroksidacije lipida i hiperglikemijom (133).

Kao što je već spomenuto u ovom istraživanju, mehanizmi koji posreduju relaksaciju aortnih prstenova na ACh izmijenjeni su HBOT-om (i kod CTR i DM štakorica), a AChIR nakon HBOT-a više nije ovisio o EETs-ima. Budući da nismo uočili nikakve značajne promjene inducirane HBOT-om u ekspresiji mRNA izoenzima koji proizvode EETs-e, moguće je da HBOT utječe na vaskularnu osjetljivost EETs-a, umjesto da utječe na njihovu sintezu. Doista, osjetljivost na ACh u prisutnosti MS-PPOH bila je značajno smanjena u usporedbi s odgovorom na ACh, sam ili u prisutnosti indometacina, ili HET0016 u skupini CTR i DM štakorica (Slika 5.2., Tablice unutar panela A i panela B). Nadalje, osjetljivost na ACh u prisutnosti L-NAME također je značajno smanjena u usporedbi s osnovnim odgovorom ili odgovorom na ACh u prisutnosti indometacina ili MS-PPOH ili HET0016 u obje skupine tretirane HBOT-om, tj. CTR + HBOT i DM + HBOT (Slika 5.2., tablice u okviru panela C i panela D). Vazodilacija ovisna o EETs-u može se smatrati važnim kompenzacijskim mehanizmom u krvnim žilama s nižom bioraspoloživošću NO (kao u DM-u) (134).

Nadalje, pokazalo se da NO smanjuje proizvodnju 20-HETE u zdravom endotelu (135), ali u stanju smanjene biodostupnosti NO, npr. DM, utjecaj 20-HETE mogao bi biti izraženiji (135). Međutim, u ovoj studiji nije uočen doprinos metabolita 20-HETE ili COX1 i COX2 AChIR-u. Zbog neliječene bolesti tjelesna masa štakorica s dijabetesom melitusom bila je značajno smanjena u usporedbi sa svim drugim skupinama štakorica. Značajno povećanje razine glukoze u krvi kod DM i DM + HBOT štakorica također potvrđuje da je DM pravilno induciran, kao što se očekivalo (Tablica 5.2.). Premda su životinje pokazivale značajne simptome neliječenog DM-a (polidipsija, polifagija, poliurija), trajanje DM-a od šest tjedana nije utjecalo na veličinu AChIR-a, što je u jednu ruku bilo iznenađujuće.

Učinci HBOT-a i dijabetesa melitusa na mehanizme AChIR-a – rezultati drugih studija na animalnim modelima

Naši su nalazi djelomično u skladu s istraživanjem Browna i suradnika, koje je pokazalo da DM ima slabi učinak na AChIR aortnih prstenova kod muških i ženskih štakora s dijabetesom u

trajanju od 8 tjedana te da blago ublažava vazorelaksaciju induciranu SNP-om, ali je pokazao nekakav učinak na funkciju miocita, npr. produženo trajanje i maksimalnu brzinu kontrakcije miokarda te trajanje relaksacije kod oba spola (136). U studiji Hopfnera i suradnika AChIR odgovori bili su prigušeni u štakora s dijabetesom u trajanju od 14 tjedana, ali ne i u štakora s dijabetesom u trajanju od 2 tjedna, dok su odgovori neovisni o endotelu (SNP-evocirani) ostali nepromijenjeni (137), slično našim rezultatima.

Razvoj promjena vaskularne reaktivnosti u DM-u ima vremenski način (49, 136, 137, 138). Primjerice, Pieper i suradnici opisali su trofazni odgovor na AChIR kod dijabetičkih muških štakora; prvo, povećanje vaskularne relaksacije 24 sata nakon indukcije DM-a, daljnja normalizacija vazorelaksacije nakon jednog i dva tjedna DM-a, i na kraju oslabljena relaksacija kao odgovor na ACh 8 tjedana nakon indukcije DM-a u modelu aortnih prstenova (49). Vremenski način razvoja vaskularnog oštećenja također može objasniti očuvani AChIR u našem istraživanju DM-a u trajanju od 6 tjedana. S druge strane, naš je pokus osmišljen kako bi razjasnio potencijalne učinke liječenja HBOT-om na mehanizme AChIR-a što je prije moguće, čak prije nego što su se pojavile vaskularne komplikacije. Stoga su sadašnji rezultati pokazali da su mehanizmi koji posreduju AChIR pod utjecajem HBOT-a, iako na veličinu odgovora (relaksaciju na ACh) nije utjecao niti DM niti HBOT.

Neke druge studije pokazale su da je kod ženki štakora u ranoj fazi DM-a, tj. u 2. tjednu DM-a, došlo do modulacije proizvodnje tromboksana A₂, ali bez promjene u NO sustavu (u njegovoj proizvodnji ili metaboličkom putu, kao što je aktivnost izoformi fosfodiesteraze). Nakon 4 tjedna trajanja DM-a, redukcija aktivnosti NO je superponirana, a aktivnost fosfodiesteraze je smanjena, dok je proizvodnja vazodilacijskih prostaglandina povećana, vjerojatno kao kompenzacijski mehanizam za održavanje normalne vaskularne reaktivnosti (138). Čini se da je to specifično za ženski spol (38) jer je u suprotnosti s našim nalazima kod muških dijabetičkih štakora, liječenih istim protokolom, gdje su sva tri vazodilacijska puta bila pod utjecajem DM-a (122). Čini se da u ovoj studiji HBOT i DM mijenjaju mehanizme vazorelaksacije prema NO-ovisnom putu. Profil ekspresije enzima uključenih u vazoreaktivnost podržava ovaj zaključak jer je zamjetno značajno povećanje ekspresije eNOS gena u CTR + HBOT štakorica, u usporedbi s CTR štakoricama, dok je ekspresija iNOS gena značajno povećana u DM štakorica u usporedbi s CTR štakoricama. Slična opažanja pronađena su u aortama Goto-Kakizaki (GK) modela štakora s DM-om genetskog tipa 2 koji je pokazao povećanu ekspresiju eNOS proteina i smanjenje razine kofaktora tetrahidrobiopterina (BH₄). Budući da GK štakori imaju smanjenu relaksaciju na ACh, sa značajno povećanom proizvodnjom superoksida i smanjenom biodostupnošću NO, uočena povećana ekspresija proteina eNOS može biti

kompenzacijske prirode (139). Naši su rezultati u skladu s tim zapažanjima. Međutim, sve promjene promatrane u našoj studiji skromne su u usporedbi s promjenama koje su nađene u mužjaka DM štakora koji su podvrgnuti HBOT-u (148), što je vjerojatno tako zbog ranije uočene pojačane vazorelaksacije inducirane ACh-om u ženki štakora u usporedbi s mužjacima (129). U ovoj je studiji relaksacija u odgovoru na SNP sačuvana u svim skupinama (Slika 5.3), što ukazuje na to da DM u trajanju od 6 tjedana i HBOT sam po sobi ne utječe negativno na odziv glatkih mišića krvnih žila na NO. Zaključno, ova studija predlaže da HBOT vrlo rano u razvoju DM-a tipa 1 mijenja mehanizme vazorelaksacije ovisne o endotelu na ACh kod ženki štakora. Ovi učinci neznatno su različiti od prethodno procijenjenih mehanizama AChIR-a u mužjaka štakora (122), u smislu pomaka iz odgovora posredovanog NO i EETs-om na pretežno NO-posredovan AChIR u ženki štakora koji su podvrgnuti HBOT-u, neovisno o DM-u. Budući da je vazorelaksacija na podražaje ovisne i neovisne o endotelu održana nakon DM-a u trajanju od 6 tjedana, NO put može se povećati kako bi se kompenzirala smanjena osjetljivost na NO i CYP450 vazodilatacijske metabolite arahidonske kiseline u DM-u.

Kao što je već rečeno, DM je jedan od glavnih čimbenika rizika za razvoj i napredak kardiovaskularnih bolesti (118). Vaskularne promjene u makro- i mikrocirkulaciji dobro su poznate i potvrđene komplikacije kod dijabetičkih bolesnika. Budući da se disfunkcija endotela smatra pretečom i najranijim ishodom kardiovaskularnih bolesti koji se može uočiti (119), vazodilatacija ovisna o endotelu (također testirana ACh induciranom vaskularnom relaksacijom izoliranih aortnih prstenova štakora) općenito se koristi kao parametar za procjenu endotelne funkcije arterija u različitim patološkim stanjima, uključujući DM. Prema tome, prijavljena je endotelna disfunkcija i kod pacijenata i kod pokusnih životinja s dijabetesom (120, 121). S druge strane, studije koje su istraživale vremenske i patofiziološke mehanizme uključene u razvoj dijabetesa (studije na životinjskom modelu) donijele su oprečne rezultate koji ukazuju na normalne ili čak pojačane odgovore endotela (141, 142, 143).

Najvažnije otkriće ove studije je da DM tip 1 u trajanju od 6 tjedana nije utjecao na vaskularnu reaktivnost izoliranih aortnih prstenova u ne-OVX SD štakorica, ali je značajno narušio vazorelaksaciju kao odgovor na ACh u OVX štakorica. Iako je DM tip 1 u ne-OVX i OVX štakorica rezultirao smanjenom osjetljivošću na ACh, oslabljena vazorelaksacija na ACh bila je vidljiva samo kod OVX-DM štakorica, ali ne u ne-OVX-DM u usporedbi s njihovim kontrolama. Ovi rezultati upućuju na to da ženski spolni hormoni mogu imati zaštitni učinak (barem privremeno) na vaskularnu relaksaciju kod štakorica sa DM-om tipa 1. Nadalje, selektivna inhibicija EETs epoksidacije nije smanjila AChIR u OVX-DM štakorica kao u odgovarajućim OVX-CTR pandanima, što ukazuje na to da DM tip 1 *per se* umanjuje

vazorelaksaciju kao odgovor na ACh kod ovarijektomiranih štakorica, smanjenjem odgovora na EETs. Ovaj zaključak potkrijepljen je nalazom da je DM tip 1 smanjio ekspresiju mRNA za CYP4A3 (specifični enzim CYP 450 koji katalizira reakcije epoksidacije u arahidonskoj kiselini) u tkivu torakalne aorte u OVX-DM štakorica u odnosu na njihove kontrole (OVX-CTR skupina). Rezultati ove studije potvrdili su prethodna otkrića o zaštitnom učinku estrogena na vaskularnu i endotelnu funkciju jer su i OVX kontrole i štakorice s DM-om tipa 1 pokazale smanjenu vazorelaksaciju na ACh u odnosu na ne-OVX-CTR i ne-OVX-DM štakorice.

Međudjelovanje dijabetesa i estrogena

Niža incidencija kardiovaskularnih poremećaja u žena u premenopauzi nego kod muškaraca iste životne dobi pripisana je zaštitnom učinku ženskog spola i spolnih hormona (estrogena) na kardiovaskularni sustav (144, 145). Žene s dijabetesom imaju veći morbiditet i mortalitet od kardiovaskularnih bolesti u usporedbi s općom ženskom populacijom (146, 147). S druge strane, nedavna opsežna klinička ispitivanja pokazala su da su žene u postmenopauzi na hormonskoj nadomjesnoj terapiji imale značajno nižu učestalost dijabetesa, unatoč tome što nije zabilježeno poboljšanje u vaskularnim ishodima (148, 149). DM i estrogen očito imaju važno i složeno međudjelovanje, ali potencijalni mehanizmi tog međudjelovanja uglavnom su nepoznati. Učinci neliječnog DM-a tipa 1 i estrogena na tjelesnu masu dobro su definirani. Budući da insuficijentni inzulin sprječava apsorpciju glukoze u tjelesne stanice, jedan od prvih simptoma neliječnog DM-a tipa 1 gubitak je mase (osim poliurije, polidipsije i polifagije) (150), koji je bio konzistentan s nižom tjelesnom masom kod životinja s DM-om tipa 1 (i OVX i ne-OVX) u usporedbi s njihovim odgovarajućim kontrolama izmjerenim u ovoj studiji. Ranije studije izvijestile su da je ovarijska neoplazija povećala unos hrane, tjelesnu masu i tjelesnu masnoću u pokusnih životinja, a takav učinak estrogena protiv pretilosti također je primijećen u rezultatima ove studije (151, 152). Nadalje, dobro je prihvaćen vaskulo- i endotel-zaštitni učinak estrogena jer su brojna istraživanja više puta pokazala da ovarijska neoplazija kod pokusnih životinja umanjuje vaskularnu relaksaciju u različitim vaskularnim posteljama i kao odgovor na različite stimulanse (153, 154), što je potvrđeno sadašnjim rezultatima koji su pokazali da OVX štakorice (i CTR i DM) imaju oslabljenu relaksaciju izoliranih aortnih prstenova kao odgovor na ACh u usporedbi s ne-OVX štakoricama. Osim toga, naši rezultati pokazali su da su i ne-OVX i OVX dijabetičke štakorice tipa 1 imale povećanu razinu oksidativnog stresa (TBARS) u usporedbi s njihovim zdravim kontrolama, što je u skladu s ranijim istraživanjima koja pokazuju da je DM karakteriziran povećanom proizvodnjom reaktivnih oksidacijskih vrsta (ROS). OVX štakorice (i CTR i DM) imale su značajno povišenu razinu oksidativnog stresa u usporedbi s ne-OVX štakoricama, što ukazuje da prisutnost estrogena može djelovati zaštitno protiv štetnog učinka oksidativnog stresa (barem do određene mjere). U ovom istraživanju pokazali smo da je DM tip 1 u trajnju od 1 tjedna rezultirao smanjenom osjetljivošću aortnih prstenova na ACh u ne-OVX i OVX štakorica. Međutim, AChIR nije oštećen kod ne-OVX-DM štakorica, samo u onim OVX-DM u usporedbi s njihovim odgovarajućim kontrolama, što ukazuje da estrogeni mogu imati zaštitni učinak na vaskularnu relaksaciju kod dijabetičkih štakorica tipa 1. Ostaje pitanje zašto povišena razina oksidativnog stresa (zbog DM-a tipa 1)

nije praćena oslabljenom vaskularnom reaktivnošću kod ne-OVX štakorica, ali je bila u OVX štakorica, ili zašto se vaskularna reaktivnost nije razlikovala između ne-OVX-CTR i OVX-CTR štakorica unatoč značajno različitim razinama oksidativnog stresa. Pokazalo se da dijabetes tipa 1 smanjuje vaskularni odgovor na ACh u aortama ženki štakora (izloženost visokoj glukozi u trajanju od 3 sata, DM u trajanju od 1 ili 8 tjedana) (155, 156, 157). Nasuprot tome, drugi su izvijestili da AChIR aortalnih prstenova nije oštećena kod dijabetičkih ženki miševa (DM tip 1 u trajanju od 10 tjedana) (141). Nadalje, nekoliko je studija pokazalo da su aortni prstenovi OVX dijabetičnih štakorica slabije reagirali na ACh (158, 159), oboje u skladu s našim nalazima. Osim njihovih učinaka na proizvodnju NO (157), estrogenu utječu na putove COX-a u vaskularnom zidu, kao što je PGI-posredovani put, kao i aktivnost COX-a i prostaciklinske sintaze (159). Štoviše, objavljeno je da ponovno uvođenje estrogena djelomično poboljšava vaskularni odgovor, sugerirajući da estrogen ili fitoestrogen mogu poboljšati vaskularnu dilataciju ovisnu o endotelu kod životinja s ovarijektomijom (157). Također je objavljeno korisno djelovanje agonista estrogenskih receptora u specifičnim aspektima vaskularne upale povezane s DM-om tipa 1 (122).

Učinci dijabetesa tipa 1 na mehanizme AChIR-a u neovarijektomiranih i ovarijektomiranih štakorica

Iako je NO glavni medijator vazodilatacije ovisne o endotelu, promjene u NO-ovisnom putu ne mogu u potpunosti odgovoriti na razvoj endotelne disfunkcije (49). U ovoj studiji NO-ovisni dio vazorelaksacijskih mehanizama bio je očuvan i slično zastupljen u obje skupine sa DM-om tipa 1, bez obzira na ovarijektomiju. Međutim, mRNA ekspresija za iNOS u tkivu aorte štakorica značajno se povećala u OVX DM skupini u odnosu na OVX CTR skupinu štakorica, što je u skladu s povećanjem proizvodnje iNOS-a u primarnim kulturama glatkih mišićnih stanica (SMCs) aorte štakorica izoliranih iz štakorica s dijabetesom tipa 1 (158). Mi pretpostavljamo da povećana količina iNOS-a i posljedično povećanje sinteze NO može biti privremeni kompenzacijski mehanizam ovisan o prisutnosti estrogena jer je AChIR očuvan u ne-OVX štakorica s DM-om tipa 1 (ali ne u OVX-DM štakorica). Nadalje, u ovoj studiji nije bilo funkcionalnih vaskularnih razlika u dijelu vazorelaksacijskih mehanizama koji su ovisni o COX-1 i COX-2 ili između zdravih štakorica i štakorica s DM-om tipa 1, bez obzira na ovarijektomiju. Međutim, ekspresija mRNA za COX-2 bila je značajno smanjena, a ekspresija mRNA za TBXAS1 značajno povećana u ovarijektomiranih štakorica s DM-om tipa 1. Poznato je da TBXAS1 katalizira pretvorbu prostaglandina H₂ u tromboksan A₂, snažni vazokonstriktor (159). Iako rezultati funkcionalnih istraživanja u ovoj studiji ne podržavaju ulogu COX-

deriviranih metabolita u vaskularnom odgovoru na ACh u ovarijektomiranih štakorica s DM-om tipa 1, u razvoju dijabetičkih vaskularnih oštećenja učinak vazokonstrikcije ovisne o COX-u ne bi trebalo zanemariti u dugotrajnom dijabetesu.

Uloga EETs-a u vazorelaksaciji u dijabetičkih štakorica

Neka ranija istraživanja sugerirala su da DM interferira s hiperpolarizacijskim čimbenikom izvedenim iz endotela (EDHF) posredujući vazodilataciju, ali još uvijek nedostaju studije koje razlikuju učinak DM-a na pojedinačne EDHF-e (npr. CYP450 metaboliti AA-EET, kalijev ion, H₂O₂ itd.) (122, 135, 159). Prijavljeno je da NO inhibira aktivnost CYP, što može sugerirati da EET/EDRF putevi imaju manju ulogu u zdravoj krvnoj žili, ali postaju važni vazodilatatori u krvnim žilama s nižom bioraspoloživostu NO (kao u slučaju DM-a) (159). Naša skupina nedavno je izvijestila da su EETs-i važan, ali djelomičan medijator AChIR izoliranih aortnih prstenova u muških dijabetičkih štakora (DM tip 1 u trajanju od 6 tjedana) (127). Unatoč potencijalnom kompenzacijskom vazodilatacijskom učinku u uvjetima smanjene biodostupnosti NO, neke istraživačke skupine izvijestile su o značajno smanjenoj aktivnosti EETs-a u životinja s DM-om tipa 1 (159). Nadalje, studije na životinjskom modelu pokazuju da povećana aktivnost EETs-a (spriječavanjem njihove degradacije ili dodatkom prehrani) (122) može ublažiti napredovanje bolesti povezane s DM-om kroz višestruke mehanizme (159). Stoga se čini da je kontroliranje endogenih razina EETs-a učinkovita strategija za zaštitu kardiovaskularnog sustava od glukotoksičnosti (122). Nedavna studija pokazala je da NO i EDHF, uglavnom EETs-i, dominiraju u ACh induciranoj vazodilataciji u lučnim bubrežnim arterijama mršavih Zucker štakora mužjaka te da je doprinos i NO i EETs-a smanjen kod štakora s dijabetesom (160). U sadašnjem istraživanju trajanja DM-a tipa 1 od šest tjedana izazvalo je podregulaciju CYP4A3 izozima, koji posebno sudjeluje u sintezi EETs-a kod OVX štakorica, što ukazuje da DM tip 1 mijenja vaskularnu reaktivnost u OVX ženki štakora inhibicijom stvaranja EETs-a i pokazuje ovisnost djelovanja CYP450 4A3 na homeostazu glukoze.

Nismo pronašli nikakve studije koje bi istraživale mehanizme AChIR-a u izoliranim aortnim prstenovima ili ekspresiju enzima mRNA koji kataliziraju sintezu vazoaktivnih medijatora u tkivu aorte u ženki štakora s DM-om tip 1 (ne-OVX ili OVX). Estrogen modulira produkciju i oslobađanje EDHF-a (ali ne i diferencijaciju) (161). Prema dostupnim podacima čini se da estrogen ima zaštitne učinke na nedijabetički endotel, povećanjem proizvodnje ili oslobađanja čimbenika relaksacije izvedenih iz endotela (NO, EDHF i PGI) i smanjenjem oslobađanja ili djelovanja kontrakcijskih čimbenika izvedenih iz endotela (PGF_α, TXA₂, ANG II) (161, 162).

Međutim, treba uzeti u obzir da sve arterije ne reagiraju na estrogen na isti način, a kako estrogen utječe na mnoge endotelne procese, nužno je bolje razumjeti molekularne mehanizme pomoću kojih estrogen modulira vaskularne reakcije (u različitim vaskularnim ležajima) kako u zdravlju tako i u bolesti, uključujući DM. Zaključno, ovo je prva studija: 1) koja pokazuje da trajanje DM-a tipa 1 od 6 tjedana slabi reaktivnost aortalnih prstenova na ACh samo u OVX, ali ne i u ne-OVX ženskih SD štakora, što ukazuje na to da ženski spolni hormoni mogu imati zaštitni učinak (barem privremeno) na vaskularnu relaksaciju kod štakora s DM-om tipa 1; 2) koja mjeri značajno smanjene ekspresije CYP4a3 mRNA u tkivu torakalne aorte OVX-DM štakorica u usporedbi s njihovim kontrolama (OVX-CTR skupina); i 3) koja pokazuje da selektivni inhibitor epoksidacije EETs-a nije smanjio AChIR u OVX-DM štakorica kao u OVX kontrolama, zajedno ukazujući da 6-tjedno trajanje dijabetesa tipa 1 u OVX štakorica smanjuje sintezu EETs-a i time narušava vazorelaksaciju izoliranih aortalnih prstenova na ACh u OVX štakorica, upravo tako što smanjuje brzinu reagiranja na EETs-e. Naši rezultati predstavljaju korak prema opsežnijem znanju i razumijevanju uloge ženskih spolnih hormona i regulatornih svojstava EETs-a u makrovaskularnoj funkciji zdravih štakorica i štakorica s dijabetesom tipa 1.

7. ZAKLJUČCI

- 1) Ovo je prva studija koja pokazuje da trajanje DM-a tipa 1 od 6 tjedana slabi reaktivnost aortnih prstenova na ACh samo u OVX, ali ne i u ne-OVX ženskih SD štakora, što ukazuje na to da ženski spolni hormoni mogu imati zaštitni učinak (barem privremeno) na vaskularnu relaksaciju kod štakora s DM-om tipa 1.
- 2) Ovo je prva studija koja mjeri znatno smanjene ekspresije CYP4a3 mRNA u tkivu torakalne aorte OVX-DM štakorica u usporedbi s njihovim kontrolama (OVX-CTR skupina) i koja pokazuje da selektivni inhibitor epoksidacije EETs-a nije smanjio AChIR u OVX-DM štakorica kao u OVX kontrolama, zajedno ukazujući da 6-tjedno trajanje dijabetesa tipa 1 u OVX štakorica smanjuje sintezu EETs-a i time narušava vazorelaksaciju izoliranih aortnih prstenova na ACh u OVX štakorica, upravo tako što smanjuje brzinu reagiranja na EETs-e.
- 3) Naši rezultati predstavljaju korak prema opsežnijem znanju i razumijevanju uloge ženskih spolnih hormona i regulatornih svojstava EETs-a u makrovaskularnoj funkciji zdravih štakorica i štakorica s dijabetesom tipa 1.
- 4) Stoga je znanstveni doprinos ovog istraživanja po prvi put demonstriran učinak HBOT na mehanizme vaskularne reaktivnosti kod jedinki ženskog spola s dijabetesom melitusom tipa 1 te razjašnjavanja mehanizama vazoreaktivnosti na o endotelu- ovisne stimulatore (kao što je acetilkolin).

8. SAŽETAK

Cilj: Cilj predložene doktorske disertacije bio je utvrditi kako HBOT utječe na funkciju krvnih žila te identificirati specifične mehanizme kojima HBOT utječe na relaksaciju aortalnih prstenova potaknutu acetilkolinom kod zdravih štakorica i dijabetičkih štakorica.

Dodatni cilj bio je rasvijetliti ulogu 20-HETE u makrovaskularnoj reaktivnosti ovisnoj o endotelu kod ženki dijabetičkih štakora.

Uvod: U stanjima smanjene dopreme kisika tkivu kao dopunsku terapiju koristimo hiperbaričnu oksigenaciju (HBOT). Promjene parcijalnog tlaka kisika (pO_2) mogu djelovati na sintezu metabolita arahidonske kiseline i mogu mijenjati vaskularnu reaktivnost u zdravih i bolesnih pacijenata proizvodnjom CYP450 metabolita. U zdravih životinja relaksacijski odgovor na hipoksiju posredovan je prostaciklinom (PGI_2), a relaksacija kao odgovor na acetilkolin (ACh) posredovana je uglavnom NO putem.

Materijali i metode: U ovoj studiji koristio sam Sprague-Dawley (SD) štakorice u dobi od 12 tjedana starosti u vrijeme pokusa, trajanje dijabetesa 6 tjedana. Životinje su bile podijeljene u 4 skupine: skupina 1 (CTR) – zdrave neliječene štakorice, skupina 2 (DM) – štakorice kojima je izazvan dijabetes melitus tip 1 pomoću streptozocina, skupina 3 (DM + HBOT) – štakorice s DM-om izložene djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori, skupina 4 (CTR + HBOT) – zdrave štakorice izložene djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori. Dodatno su uvedene još dvije skupine ovarijektomiranih zdravih (CTR + OVX) i dijabetičkih (DM + OVX) štakorica. Vaskularni odgovor na kumulativne koncentracije acetilkolina (10^{-10} – 10^{-5} M) u prekontrahiranim aortalnim prstenovima mjerio se s/bez indometacina, L-NAME, MS-PPOH te HET0016. Odvojeno su se provodili pokusi s natrij-nitroprusidom (SNP). U svrhu utvrđivanja utjecaja HBOT-a na izražajnost enzima koji stvaraju metabolite odgovorne za vaskularnu reaktivnost u odgovoru na ACh, određivao sam mRNA za eNOS, iNOS, CYP450- ω hidroksilazu (izoforme), COX 1, 2; TXA2 sintazu i PGI_2 sintazu te vaskularne izoforme CYP450 epoksigenaze u sve 4 skupine štakorica.

Rezultati: Nije bilo značajne razlike u AChIR izoliranih aortalnih prstenova štakorica među skupinama. U CTR i DM skupini štakorica analiza osjetljivosti aortalnog prstena na ACh pokazala je da je osjetljivost na ACh u prisutnosti L-NAME i u prisutnosti MSPPOH znatno smanjena u usporedbi s osnovnim odgovorom ili odgovorom na ACh u prisutnosti indometacina. U CTR + HBOT i DM + HBOT skupini samo prisutnost L-NAME, ali ne i MS-

PPOH ili INDO znatno je smanjila AChIR izoliranih aortnih prstenova štakorica. Ekspresija mRNA za iNOS u aortnom tkivu štakorica znatno je povećana u DM skupini štakorica u usporedbi s CTR skupinom štakorica. Ekspresija mRNA za eNOS, COX-1, COX-2, TBXAS1, CYP2J3, CYP4A1 i CYP4A3 u tkivu torakalnih aorta nije bila znatno različita među eksperimentalnim skupinama štakorica. Ova studija pokazuje da trajanje DM-a tipa 1 od 6 tjedana slabi reaktivnost aortnih prstenova na ACh samo u OVX štakorica, ali ne i kod ne-OVX SD štakorica.

Zaključak: HBOT i DM mijenjaju mehanizme vazorelaksacije prema NO ovisnom putu. Trajanje DM-a tipa 1 od 6 tjedana slabi reaktivnost aortnih prstenova na ACh samo u OVX štakorica, ali ne i kod ne-OVX SD štakorica, što ukazuje na to da ženski spolni hormoni mogu imati zaštitni učinak (barem privremeno) na vaskularnu relaksaciju kod štakorica s DM-om tipa 1. Primjena HBOT-a u strogo definiranim uvjetima pokusa (2 atm, 120 minuta, 4 dana uzastopno) ne povećava oksidativni stres. Rezultati ove studije potvrdili su prethodna otkrića o zaštitnom učinku estroгена na vaskularnu i endotelnu funkciju jer su i OVX kontrole i štakorice s dijabetesom tipa 1 pokazale smanjenu vazorelaksaciju na ACh u odnosu na ne-OVX-CTR i ne-OVX-DM štakorice.

Ključne riječi: vaskularna reaktivnost, DM, HBOT, EETs, estrogeni, štakorice.

9. SUMMARY

EFFECT OF HYPERBARIC OXYGEN THERAPY ON MODULATION OF MACROVASCULAR REACTIVITY IN FEMALE RATS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Objective: The objective of the proposed dissertation was to determine how HBOT affects vascular function and to identify specific mechanisms through which HBOT affects acetylcholine-induced relaxation of aortic rings in healthy and diabetic female rats.

Additional objective was to clarify the role of 20-HETE in endothelium-dependent macrovascular reactivity in diabetic female rats.

Introduction: Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) is used as complementary treatment in cases of hypoxia. Changes in partial pressure of oxygen (pO₂) may affect the synthesis of arachidonic acid metabolites, and change vascular reactivity in health and disease by producing CYP450 metabolite. In healthy animals, relaxation response to hypoxia is mediated by prostacyclin (PGI₂), and relaxation response to acetylcholine (ACh) is mediated mainly by NO pathway.

Materials and Methods: Sprague-Dawley (SD) female rats used in this study were 12 weeks old at the time of the experiment, with diabetes duration of 6 weeks. The animals were divided into 4 groups: group 1 (CTR) – healthy untreated female rats, group 2 (DM) – female rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus, group 3 (DM + HBOT) – female rats with DM exposed to hyperbaric oxygen in a hyperbaric chamber, group 4 (CTR + HBOT) – healthy female rats exposed to hyperbaric oxygen in a hyperbaric chamber. In addition, two more groups of healthy ovariectomized female rats (CTR+OVX) and ovariectomized diabetic female rats (DM + OVX) were included in the study. Vascular response to cumulative acetylcholine concentrations (10^{-10} – 10^{-5} M) in precontracted aortic rings was measured in the presence/absence of indomethacin, L-NAME, MS-PPOH and HET0016. Experiments with sodium nitroprusside (SNP) were conducted separately. For the purpose of determining the effect of HBOT on the expression of enzymes producing metabolites responsible for vascular reactivity in response to ACh, mRNA was determined for eNOS, iNOS, CYP450- ω hydroxylase (isoforms), COX 1,2; TXA₂ synthase and PGI₂ synthase, and vascular isoforms of CYP450 epoxigenases in all 4 groups of female rats.

Results: There were no significant differences in AChIR of isolated aortic rings between different rat groups. In the CTR and DM groups of rats, sensitivity analysis of aortic ring to ACh has shown that sensitivity to ACh in the presence of L-NAME and MS-PPOH is significantly reduced compared to the basic response or response to ACh in the presence of indomethacin. In the CTR + HBOT and DM + HBOT groups, only the presence of L-NAME significantly reduced the AChIR of isolated aortic rings of rats, whereas the presence of MS-PPOH or indomethacin had no such effect. mRNA expression of iNOS in rat aortic tissue in the DM group was significantly increased in comparison with the CTR group. mRNA expression of eNOS, COX-1, COX-2, TBXAS1, CYP2J3, CYP4A1 and CYP4A3 in thoracic aorta tissue was not significantly different between the experimental groups of female rats. This study has shown that 6-week T1DM reduces the reactivity of aortic rings to ACh only in the OVX female SD rats.

Conclusion: HBOT and DM modify the vasorelaxation mechanisms according to NO-dependent pathway. 6-week T1DM reduces the reactivity of aortic rings to ACh only in the OVX female SD rats, but not in the non-OVX ones, which indicates that female sex hormones can have a protective effect (at least temporarily) on vascular relaxation in female rats with T1DM. Application of HBOT under strictly defined experimental conditions (2 atm, 120 minutes, 4 consecutive days) does not increase oxidative stress level. Results of this study confirmed previous discoveries on the protective effect of estrogen on vascular and endothelial function, since both the OVX controls and the T1DM female rats exhibited reduced vasorelaxation to ACh in comparison with the non-OVX-CTR and non-OVX-DM groups of female rats.

Keywords: Vascular reactivity, DM, HBOT, EETs, estrogens, female rats

.

10. LITERATURA

1. InterAct Consortium. Adherence to predefined dietary patterns and incident type 2 diabetes in European populations: EPIC- interact study. *Diabetologia* 2014; 57: 321-333.
2. Dabelea D, Mayer- Davis EJ, Saydah S, Imperatore G, Linder B, Divers J, Bell R, badaru A, talton J, Crume T, Liese A, Merchant A, Lawrence J, Reynolds K, Dolan L, Liu L, Hamman R. Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. Search for Diabetes in youth study. *JAMA* 2014; 311: 1778-1786.
3. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2005; 28: S37- 42.
4. National Diabetes Fact Sheet. National Center for Disease Prevention and Health promotion. Available at: <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/factsheet.htm>. Accessed January 4, 2005.
5. Edelman SV. Glycemic Control: The Future of Diabetes Association 61st Scientific Session. Philadelphia, PA. June 26, 2001. Available at. <http://www.diabetes.org>. Accessed October 24, 2005.
6. Vrhovac B, Francetić I, Jakšić B, Labar B, Vucelić B. Interna medicina. 11.poglavlje Šećerna bolest. 3 izd. Naknada Ljevak, 2003; str. 1264-1284.
7. Junquera LC, Carneiro J. Osnove histologije. Udžbenik i atlas. Prema desetom američkom izdanju. 11. poglavlje Žilni sustav. ŠK, Zagreb, 2005.
8. Srikanth S, Deedwania P. Primary and secondary prevention strategy for cardiovascular disease in diabetes mellitus, *Cardiology Clinics*, 2011; 29: 47-70.
9. Moore SA, Bohlen HG, Milleer BG, Evan AP, Cellular and vessel wall morphology of cerebral cortical arterioles after short- term diabetes in adult rats, *Blood Vessels* 1985; 22: 265-277.
10. Ružić A, Miletić B, Noal AL, Peršić V, Ražov Radaš M, Včev A. Endotelna disfunkcija u „enigmatskoj slagalici“ kardiovaskularnih bolesti. *Med. Glass* 2009; 6: 2- 15.

11. Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VWM. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res* 2009; 335: 165-189.
12. Feron O, Belhassen L, Kobzik T, Smith R, Kelly R, Michel T. 1996. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271: 22810–22814.
13. Brayden JE, Large WA. Electrophysiological analysis of neurogenic vasodilatation in the isolated lingual artery of the rabbit. *Br J Pharmacol* 1986; 89: 163-171.
14. Newcomer SC, Taylor JC, Bowles DK, Laughlin MH. Endothelium-dependent and -independent relaxation in the forelimb and hindlimb vasculatures of swine. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007;148: 292-300.
15. Thomas M, Feron O. Nitric oxide synthases. Which, where, how and why? *J Clin Invest* 1997; 100: 2146-2152.
16. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Review article. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
17. Ding H, Triggle CR. Endothelial cell dysfunction and the vascular complications associated with type 2 diabetes: assessing the health of the endothelium. *Vascular Health and Risk Management* 2005; 1: 55-71.
18. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1993; 28: 97-99.
19. Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension* 1994; 23(6 Pt 2): 1141-1147.
20. Sun D, Messina EJ, Koller A, Wolin MS, Kaley G. Endothelium-dependent dilation to L-arginine in isolated rat skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol* 1992; 262: H1211-H1216.

21. Lacza Z, Puskar M, Figueroa JP, Zhang J, Rajapakse N, Busija DW. Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 12: 1609-1615.
22. Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1995; 213: 896-900.
23. Drenjančević I, Jukić I, Mihaljević Z, Ćosić A, Kibel A. The metabolites of Arachidonic Acid in Microvascular Function // *Microcirculation Revisited-From Molecules to Clinical Practice* / Helena Lenasi (ur.). Rijeka: IN TECH d.o.o, 2016. str. 1011- 1033.
24. Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 55-90.
25. Spector AA, Norris AW. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C996-C1012.
26. Wang Z, Wei Y, Falck JR, Atcha KR, Wang WH. Arachidonic acid inhibits K channels in the cortical collecting duct via cytochrome P-450 epoxigenase-dependent metabolic pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: F1441-1447.
27. Snider NT, Kornilov AM, Kent UM, Hollenberg PH. Anandamide metabolism by human liver and kidney microsomal cytochrome p450 enzymes to form hydroxyeicosatetraenoic and epoxyeicosatrienoic acid ethanolamides. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 321: 590-597.
28. Hercule HC, Salanova B, Essin K, Honeck H, Falck JR, Sausiber M, i sur. The vasodilator 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid targets the poreforming BK α channelsubunit in rodents. *Exp Physiol* 2007; 92: 1067-1076.
29. Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension* 2007; 49: 590-596.
30. Vallance PJT, Webb DJ. Vascular endothelium in human physiology and pathophysiology - chapter 12 - The eicosanoids: Cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxigenase pathways. 2008; 332-361.

31. Fitzgerald SM, Kemp-Harper BK, Tare M, Parkinson HC. Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelial dysfunction during diabetes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2005; 32: 482-487.
32. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacological Sciences* 2002; 23: 374-380.
33. Campbell WB, Harder DR. prologue: EDHF-what is it? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H2413-H2416.
34. Garland CJ, Planc F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: A role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 23-30.
35. Campbell WB, Harder DR. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circ Res* 1999; 84: 484-488.
36. Pieper GM, Langenstroer P, Siebeneich W. Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. *Cardiovascular Research* 1997; 34: 145-156.
37. Lacza Z, Puskar M, Kis B, Perciaccante JV, Miller AW, Busija DW. Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H406-H41137.
38. Brayden JE, Large WA. Electrophysiological analysis of neurogenic vasodilatation in the isolated lingual artery of the rabbit. *Br J Pharmacol* 1986; 89: 163-171.
39. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *Journal of applied physiology* 2009;106: 988-995.
40. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing- more than a nutrient. *World J Surg* 2004; 28: 294-300.
41. Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Radical Research* 2007; 41: 1364-1375.
42. Armitage ME, Wingler K, Schmidt HW, La M. Translating the oxidative stress hypothesis into the clinic: NOX versus NOS. *J Mol Med* 2009; 87: 1071-1076.

43. Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rat: role of free radicals. *Am J Physiol* 1994; 266: H1153-H1161.
44. Taylor PD, Graves JE, Poston L. Selective impairment of acetylcholine-mediated endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Clin Sci* 1995; 88: 519-534.
45. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediated endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992; 263: H321-H326.
46. Hattori Y, Kawasaki H, Abe K, Kanno M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 1991; 261: H1086-H1094.
47. Heygate KM, Lawrence IG, Bennett MA, Thurston H. Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 3251-3259.
48. Dai FX, Diederich A, Skopec J, Diederich D. Diabetes-induced endothelial dysfunction in streptozotocin-treated rats: role of prostaglandin endoperoxides and free radicals. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4: 1327-1336.
49. Pieper GM. Enhanced, unaltered and impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration. *Diabetologia* 1999; 42: 204-213.
50. Karisalo MM, Raiha I, Sivenius J, Immonen-Raiha P, Lehtonen A, Sarti C, Mahonen M, Torppa J, Tuomilehto J, Salomaa V. Diabetes worsens the outcome of acute ischemic stroke. *Diabetes Res Clin Practice* 2005; 69: 293-298.
51. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation and products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18: 1- 14.
52. Pieper GM. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes. Protective role of arginine on endothelial dysfunction. *Hypertension* 1998; 31: 1047-1060.

53. Katusic ZS. Vascular endothelial dysfunction: Does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol* 2001; 281: H981-H986.
54. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001; 88: E14-E22.
55. Zenere BM, Arcaro G, Saggiani F, Rossi L, Muggeo M, Lechi A. Noninvasive detection of functional alterations of the arterial wall in IDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes Care* 1995; 18: 975-982.
56. Gazis A, White DJ, Page SR, Cockcroft JR. Effect of oral vitamin E (alphatocopherol) supplementation on vascular endothelial function in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999; 16: 304-311.
57. Bagi Z, Koller A. Lack of nitric oxide mediation of flow-dependent arteriolar dilation in type i diabetes is restored by sepiapterin. *J Vasc Res* 2003; 40: 47–57.
58. Lash JM, Bohlen HG. Structural and functional origins of suppressed acetylcholine vasodilation in diabetic rat intestinal arterioles. *Circ Res* 1991; 69: 1259-1268.
59. Sartoretto JL. Metformin treatment restores the altered microvascular reactivity in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats increasing NOS activity, but not NOS expression. *Life Sciences* 2005; 77: 2676-2689.
60. Hadi HAR, Suwaidi JAI. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vascular Health and Risk Management* 2007; 3: 853-876.
61. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation and products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18: 1- 14.
62. Duncan JG. Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813: 1351- 1359.
63. Goklin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006, 114: 597- 605.
64. Xie L, Zhu X, Hu Y, Li T, Gao Y, Shi Y, Tang S. Mitochondrial DNA oxidative damage triggering mitochondrial dysfunction and apoptosis in high glucose- induced HRECs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 4203-4209.

65. American Diabetes Association Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010; 33(supp 1): 62-69.
66. Syed Ikmal SI, Zaman Huri H, Vethakkan SR, Wan Ahmad WA. Potential biomarkers of insulin resistance and atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus patients with coronary artery disease. *Int j Endocrinol* 2013; 20113: 698567.
67. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010; 107: 1058- 1070.
68. Kilhovd BK, Giardino I, Torjesen PA, Birkeland KI, Berg TJ, Thomalley PJ, Brownlee M, hansen KF. Increased serum levels of the specific AGE-compound methylglyoxal-derived hydroimidazolone in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2003; 52: 163-167.
69. Cai W, Gao QD, Zhu L, Peppia M, He C, Vlassara H. Oxidative stress inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Mol Med* 2002; 8: 337– 346.
70. Goldberg T, Cai W, Peppia M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* 2004; 104: 1287–1291.
71. Folli F, Corradi D, Fanti P, Davalli A, Paez A, Giaccari A, Perego C, Muscogiuri G. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: Avenues for a mechanistic- based therapeutic approach. *Curr Diabetes Rev* 2011; 7: 313-24.
72. Tian J, Hu S, Sun Y, Yu H, Han X, Cheng W, Ban X, Zhang S, Yu B, Yang IK. Vasa vasorum and plaque progression and responses to atorvastatin in rabbit model of atherosclerosis: Contrast- enhanced ultrasound imaging and intravascular ultrasound study. *Heart* 2013; 99: 48- 54.
73. Bagi Z, Toth E, Koller A, Kaley G. Microvascular dysfunction after transient high glucose is caused by superoxide-dependent reduction in the bioavailability of NO and BH₄. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H626-H633.

74. Garland CJ, Planc F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: A role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 23-30.
75. Anvaruddin S, Askari AT, Topol EJ. Redefining risk in acute coronary syndromes using molecular medicine. *J Am Col Cardio*. 2007; 49: 279-289.
76. Howard-Alpe GM, Sear JW, Foex P. Methods of detecting atherosclerosis in non-cardiac surgical patients; the role of biochemical markers. *Br J Anaesth* 2006; 97: 758-769.
77. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Munzel T, Simons ML, Hamm CW. CAPTURE investigators. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 108: 1440-1445.
78. Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med* 2002; 30: S302-S312.
79. Asagami T, Abbasi F, Stuelinger M, Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med*. 2002; 30:S302-S312 lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2002; 51: 843-846.
80. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blackhke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginin (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98: 1842-1847.
81. Lash JM, Nase GP, Bohlen G. Acute hyperglycemia depresses arteriolar NO formation in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 277: H1513-H1520.
82. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, i sur. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001; 88: E14-E22.
83. Park Y, Capobianco S, Gao X, Falck JR, Dellsperger KC, Zhang C. Role of EDHF in type 2 diabetes-induced endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295: H1982-H1988.
84. Takahashi K, Ghatei MA, Lam HC, Halloran J, Bloom SR. Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990; 33: 306-310.

85. Yamauchi T, Ohnaka K, Takayanagi R, Umeda F, Nawata H. Enhanced secretion of endothelin-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Let* 1990; 267: 16-18.
86. Miasiro N, Paiva ACM. Homologous desensitization of the effects of endothelin on rabbit aorta rings and on cultured rat aorta smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.*1990; 179: 151-158.
87. Fulton DJR, Hodgson WC, Sikorski BW, King RG. Attenuated responses to endothelin-1, KCl and CaCl₂, but not noradrenaline, of aorta from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 928-932.
88. Csanyi G, Lepran I, Flesch T, Telegdy G, Szabo G, Mezei Z. Lack of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) up-regulation in endothelial dysfunction in aorta in diabetic rats. *Pharmacological Reports* 2007; 59: 447-455.
89. Peredo HA, Rodriguez R, Susemihl MC, Villareal I, Filingier E. Long-term streptozotocin-induced diabetes alters prostanoid production in rat aorta and mesenteric bed. *Auton Autacoid Pharmacol* 2006; 26: 355-360.
90. Rodriguez-Manas L, Angulo J, Vallejo S, Peiro C, Sanchez-Ferrer A, Cercas E, Lopez-Dorega P, Sanchez-Ferrer CF. Early and intermediate Amadori glycosylation adducts, oxidative stress and endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rats vasculature. *Diabetologia* 2003; 46: 556-566.
91. Gaenger H, Neumayr G, Marschang P, Sturm W, Lechleinter M, Foger B, Kirchmair R, Pathsch J. Effects of insulin therapy on endothelium-dependent dilation in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2002; 89: 431-434.
92. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 1994; 94: 1172-1179.
93. De Ciuceis C, Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, Zani F, Miclini M, Tiberio GA, Giulini SM, Paiardi S, Rizzordi N, Plato C, Agabiti-Rosei E. Effects of insulin on endothelial and contractile function of subcutaneous small resistance arteries of hypertensive and diabetic patients. *J Vas Res* 2008; 45: 512-520.

94. Rewers M, Humman R. Risk factors for non-insulin dependent diabetes. In Diabetes in America. Washington, DC, US Govt Printing Office 1995; 179-220.
95. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, King GL, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. Diabetes 1999;48: 1856-1862.
96. Jin SM, Noh CII, Yang SW, Bae EJ, Shin CH, Chang HR, Kim YY, Yun YS. Endothelial dysfunction and microvascular complications in type 1 diabetes mellitus. J Korean Med Sci 2008; 23: 77-82.
97. Brooks BA, McLennan S, Twigg SM, Yue DK. Detection and characterization of microcirculatory abnormalities in the skin of diabetic patients with microvascular complications. Diabetes Vasc Dis Res 2008; 5: 30-35.
98. Malakul W, Thirawarapan S, Suvitayavat W, Woodman OL. Type 1 diabetes and hypercholesterolaemia reveal the contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor to endothelium-dependent relaxation of the rat aorta. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2008; 35: 192-200.
99. Bakker DJ. Hyperbaric oxygen therapy and the diabetic foot. Diabetes Metab Res Rev 2000; 16: S55-S58.
100. Yin W, Badr AE, Mychaskiw G, Zhang JH. Down regulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model. Brain Research 2002; 926: 165–171.
101. Camporesi EM. Hypertbaric oxygen therapy: Committee report of the Undersea and Hyperbaric Medical Society. Kensington, MD.1996; p74.
102. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing- more then a nutrient. World J Surg 2004; 28: 294-300.
103. Drenjancevic-Peric I, Phillips SA, Falck JR, Lombard JH. Restoration of normal vascular relaxation mechanisms in cerebral arteries by chromosomal substitution in consomic SS.13BN rats. Am J Physiol 2005; 289: H188-195.

104. Karadurmus N, Sahin M, Tasci C, Naharci I, Ozturk C, Ilbasimis S, Dulkadir Z, Sen A, Saglan K. Potential benefits of hyperbaric oxygen therapy on atherosclerosis and glycemic control in patients with diabetic foot. *Endokrynol Pol* 2010; 61: 275-279.
105. Kessler L, Bilbault P, Ortega F, Grasso C, Passemard R, Stephan D, Pinget M, Schneider F. Hyperbaric oxygenation accelerates the healing rate of nonischemic chronic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2003; 26: 2378-2382.
106. Alleva R, Tomasetti M, Sartini D, Emanuelli M, Nasile E, DiDonato F, Borghi B, Santarelli L, Neuzil J. A-lipoic acid modulates extracellular matrix and angiogenesis gene expression in non-healing wounds treated with hyperbaric oxygen therapy. *Mol Med* 2008; 14: 175-183.
107. Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev* 1970; 22: 485-518.
108. Vavra JJ, Deboer C, Dietz A, Hanka LJ, Sokolsi WT. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot Annu* 1959; 7: 230-235.
109. Brentjens R, Saltz L. Islet cell tumors of the pancreas: the medical oncologic perspective. *Surg Clin North Am* 2001; 81: 527-542.
110. Mansfort KR, Opie L. comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or by alloxan. *Lancet*. 1968; 1: 670-671.
111. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Rev Bras Reumatol* 2012; 52: 462-470.
112. Manojlović D, Stupin A, Matić A, Mihaljević Z, Novak S, Drenjančević I. The role of epoxyeicosatrienoic acids in diabetes mellitus-induced impaired vascular relaxation of aortic rings in ovariectomized Sprague-Dawley rats, *Int J Endocrinology* 2019; (u tisku).
113. Brizić I. Učinci vina na izolirano srce i aortu zamorčica i štakora: značaj razlika među vrstama. *Doktorska disertacija, Split*. 2009; 37.
114. Boban M, Modun D, Music I, Vukovic J, Brizic I, Salamunic I, Obad A, Palada I, Dujic Z. Red wine induced modulation of vascular function: separating the role of polyphenols, ethanol, and urates. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47: 695-701.

115. Chomczynski P. and Sacchi N., Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162: 156-159.
116. Stupin A, Cosic A, Novak S, Vesel M, Jukic I, Popovic B, Karalic K, Loncaric Z, Drenjancevic I. Reduced Dietary Selenium Impairs Vascular Function by Increasing Oxidative Stress in Sprague-Dawley Rat Aortas. *Int J Environ Res Public Health* 2017; 14(6): pii: E591. doi: 10.3390/ijerph14060591.
117. Oakes KD, Van Der Kraak GJ. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 2003; 63: 447–463.
118. A Joint Editorial Statement by the American Diabetes Association; the National Heart, Lung, and Blood Institute; the Juvenile Diabetes Foundation International; the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; and the American Heart Association. "Diabetes Mellitus: A Major Risk Factor for Cardiovascular Disease." *Circulation* 1999; 100: 1132–1133.
119. Widmer RJ, Lerman A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Glob Cardiol Sci Pract* 2014; 2014: 291–308.
120. Opara EC. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *J R Soc Promot Health* 2002; 122: 28-34.
121. Wang JS, Singh H, Zhang F, Ishizuka T, Deng H, Kemp R, Wolin MS, Hintze TH, Abraham NG, Nasiletti A, Laniado-Scwartzman M. Endothelial dysfunction and hypertension in rats transduced with CYP4A2 adenovirus. *Circ Res* 2006; 98: 962-969.
122. Unfirer S, Mihalj M, Novak S, Kibel A, Cavka A, Mijalevic Z, Gros M, Brizic I, Budimir D, Cosic A, Boban M, Drenjancevic I. Hyperbaric oxygenation affects the mechanisms of acetylcholine-induced relaxation in diabetic rats. *Undersea Hyperb Med* 2016; 43: 787-803.
123. Wang JS, Singh H, Zhang F, et al. Endothelial dysfunction and hypertension in rats transduced with CYP4A2 adenovirus. *Circ Res*. 2006; 98: 962-969.

124. Tahepold P, Elfstrom P, Eha I, Kals J, Taal G, Talonpoika A, Valen G, Vaage J, and Starkopf J. Exposure of rats to hyperoxia enhances relaxation of isolated aortic rings and reduces infarct size of isolated hearts. *Acta Physiol Scand* 2002; 175: 271–277.
125. Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2005 ; 511: 53-64.
126. Korandji C, Zeller M, Guillard JC, Collin B, Lauzier B, Sicard P, Duvillard L, Goirand F, Moreau D, Cottin Y, Rochette L, Vergely C. Time course of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and oxidative stress in fructose-hypertensive rats: a model related to metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* 2011; 214: 310-315.
127. Kibel A, Novak S, Cosic A, Mihaljevic Z, Falck JR, Drenjancevic I. Hyperbaric oxygenation modulates vascular reactivity to angiotensin-(1-7) in diabetic rats: potential role of epoxyeicosatrienoic acids. *Diab Vasc Dis Res* 2015; 12: 33-45.
128. Fraga-Silva RA, Costa-Fraga FP, Murça TM, Moraes PL, Martins Lima A, Lautner RQ, Castro CH, Soares CM, Borges CL, Nadu AP, Oliveira ML, Shenoy V, Katovich MJ, Santos RA, Raizada MK, Ferreira AJ.. Angiotensin-converting enzyme 2 activation improves endothelial function. *Hypertension.* 2013; 61: 1233-1238.
129. Mihaljević Z, Matić A, Stupin A, Rašić L, Jukić I, Drenjančević I. Acute Hyperbaric Oxygenation, Contrary to Intermittent Hyperbaric Oxygenation, Adversely Affects Vasorelaxation in Healthy Sprague-Dawley Rats due to Increased Oxidative Stress *Oxid Med Cell Longev* 2018: 7406027.
130. Oter S, Korkmaz A, Topal T, Ozcan O, Sadir S, Ozler M, Ogur R, Bilgic H. Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. *Clin Biochem* 2005; 38: 706-711.
131. Csanyi G, Lepran I, Flesch T, Telegdy G, Szabo G, Mezei Z. Lack of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) up-regulation in endothelial dysfunction in aorta in diabetic rats. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 447-455.
132. Peredo HA, Rodríguez R, Susemihl MC, Villarreal I, Filinger E. Long-term streptozotocin-induced diabetes alters prostanoid production in rat aorta and mesenteric bed. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2006; 26: 355-360.

133. Bhardwaj P, Khanna D, Balakumar P. Catechin averts experimental diabetes mellitus-induced vascular endothelial structural and functional abnormalities. *Cardiovasc Toxicol* 2014; 14: 41-51.
134. Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB, Bartoli M, Caldwell RB, Caldwell RW. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res* 2008; 102: 95-102.
135. Li R, Xu X, Chen C, Wang Y, Gruzdev A, Zeldin D, Wang D. CYP2J2 attenuates metabolic dysfunction in diabetic mice by reducing hepatic inflammation via the PPAR γ . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015; 308(4): E270-282.
136. Brown RA, Walsh MF, Ren J. Influence of gender and diabetes on vascular and myocardial contractile function. *Endocr Res* 2001; 27(4): 399-408.
137. Hopfner RL, McNeill JR, Gopalakrishnan V. Plasma endothelin levels and vascular responses at different temporal stages of streptozotocin diabetes. *Eur J Pharmacol* 1999; 374(2): 221-227.
138. Abboud K, Bassila JC, Ghali-Ghoul R, Sabra R. Temporal changes in vascular reactivity in early diabetes mellitus in rats: role of changes in endothelial factors and in phosphodiesterase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: H836–H845.
139. Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol* 2005; 511(1): 53-64.
140. Yousif MH, Benter IF, Roman RJ. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid play a role in the enhanced cardiac dysfunction in diabetic rats following ischaemic reperfusion injury. *Auton Autacoid Pharmacol* 2009; 29(1-2): 33-41.
141. Koltai MZ, Hadhazy P, Posa I, Kocsis E, Winkler G, Rosen P, Pogatsa G. Characteristic of coronary endothelial dysfunction in experimental diabetes. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 157–163.
142. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000; 130(5): 963-74.
143. Han Y, Li X, Zhou S, Meng G, Xiao Y, Zhang W, Wang Z, Xie L, Lin Z, Lu X, Ji Y. 17 β -estradiol antagonizes the down-regulation of ER α /NOS-3 signaling in vascular

- endothelial dysfunction of female diabetic rats. *PLoS One* 2012; 7(11): e50402. doi: 10.1371/journal.pone.0050402
144. Lee WL, Cheung AM, Cape D, Zinman B. Impact of diabetes on coronary artery disease in women and men: a meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care* 2000; 23: 962–968.
 145. Roglic G. Diabetes in women: the global perspective. *Int J Gynaecol Obstet* 2009; 104 Suppl 1: S11–S13.
 146. Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E, Lin F, Grady D, Bittner V, Cauley JA, Barrett-Connor E. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2003; 138: 1–9.
 147. Margolis KL, Bonds DE, Rodabough RJ, Tinker L, Philips LS, Allen C, Bassford T, Burke G, Torrens J, Howard BV. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. *Diabetologia* 2004; 47: 1175–1187.
 148. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet* 2014; 383(9911): 69-82.
 149. Xu Y, López M. Central regulation of energy metabolism by estrogens. *Mol Metab* 2018; 15: 104-115.
 150. Wallen WJ, Belanger MP, Wittnich C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. *Journal of Nutrition* 2001; 131: 2351–2357.
 151. Zhou K, Gao Q, Zheng S, Pan S, Li P, Suo K, Simoncini T, Wang T, Fu X. 17 β -estradiol induces vasorelaxation by stimulating endothelial hydrogen sulfide release. *Mol Hum Reprod* 2013; 19: 169-176.
 152. Yamaguchi K, Honda H, Wakisaka C, Tohei A, Kogo H. Effects of phytoestrogens on acetylcholine- and isoprenaline-induced vasodilation in rat aorta. *Jpn J Pharmacol* 2001; 87: 67-73.

153. Han X, Zhang R, Anderson L, Rahimian R. Sexual dimorphism in rat aortic endothelial function of streptozotocin-induced diabetes: possible involvement of superoxide and nitric oxide production. *Eur J Pharmacol* 2014; 723: 442–450.
154. Goel A, Zhang Y, Anderson L, Rahimian R. Gender difference in rat aorta vasodilation after acute exposure to high glucose: involvement of protein kinase C beta and superoxide but not of Rho kinase. *Cardiovasc Res* 2007; 76: 351-360.
155. Han X, Shaligram S, Zhang R, Anderson L, Rahimian R. Sex-specific vascular responses of the rat aorta: effects of moderate term (intermediate stage) streptozotocin-induced diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 2016; 94(4): 408-415.
156. Takenouchi Y, Kobayashi T, Taguchi K, Matsumoto T, kamata K. Gender differences in vascular reactivity of aortas from streptozotocin-induced diabetic mice. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(10): 1692-1697.
157. Tostes R, Nigro D, Fortes Z, Carvalho M. Effects of estrogen on the vascular system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003; 36: 1143-1158.
158. Cignarella A, Bolego C, Pelosi V, Meda C, krust A, Pinna C, Gain RM, Vegeto E, Maggi A. Distinct roles of estrogen receptor-alpha and beta in the modulation of vascular inducible nitric-oxide synthase in diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328(1): 174-182.
159. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 527–536.
160. Guglielmino K, Jackson K, Harris TR, Vu V, Dong H, Dutrow G, Evans JE, Graham J, Cummings BP, Havel PJ, Chiamvimonvat N, Despa S, hammock BD, Despa F. Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase provides cardioprotection in hyperglycemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 303(7): H853-862.
161. Bracamonte MP, Miller VM. Vascular effects of estrogens: arterial protection versus venous thrombotic risk. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 204–209.

162. Tamura K, Yamaguchi K, Kogo H. 17 Beta-estradiol inhibits ovariectomy-induced expression of inducible nitric oxide synthase in rat aorta in vivo. *Life Sci* 2001; 66: PL259–264.

11. ŽIVOTOPIS

Dragan Manojlović, dr. med., spec. opće kirurgije i subspec. vaskularne kirurgije
 Vaskularni kirurg u Općoj županijskoj bolnici Vukovar i bolnici hrvatskih veterana
 Županijska ulica 35
 32000 Vukovar
 Datum i mjesto rođenja: 19. listopada 1967., Vukovar
 Kućna adresa: Kralja Tvrtka 6, 32000 Vukovar
 Broj mobitela: 099/403 76 77
 e-pošta: draganmdoc@gmail.com

Obrazovanje:

1988. – 1997.: Medicinski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu
 2001. – 2005.: specijalizacija iz opće kirurgije
 2007. – 2009.: subspecijalizacija iz vaskularne kirurgije
 2010. – danas: poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Radno iskustvo:

1998. – 2000.: Dom zdravlja Umag
 2000. – 2001.: Dom zdravlja Vukovar
 2011. – 2015.: predavač na studiju fizioterapije Veleučilišta Lavoslava Ružičke u Vukovaru
 2001. – danas: Opća županijska bolnica Vukovar i bolnica hrvatskih veterana

Tečajevi trajnog usavršavanja:

9. i 10. studenog 2001.: pohađao poslijediplomski tečaj iz područja osnova nadomještanja bubrežne funkcije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
 16. svibnja 2002.: sudjelovao na kirurškoj radionici „Hernija“, Pula
 10. – 13. listopada 2002.: završio tečaj „Principles of Operative Fracture Treatment“, Zagreb
 2. i 3. prosinca 2002.: završio tečaj „Suvremeni pristup urolitijazi“, Osijek
 4. – 6. studenog 2002.: završio tečaj „Dijagnostičke i terapijske dileme kod karcinoma prostate“, Osijek
 18. – 20. rujna 2003.: završio Drugu jesensku školu endoskopske kirurgije, Split
 3. i 4. svibnja 2007.: završio tečaj „Endoskopsko liječenje preponske kile“, Vukovar

22. veljače 2008.: završio poslijediplomski tečaj „Novosti u kirurškom liječenju bolesti gušterače“, KBC Dubrava, Zagreb

10. listopada 2010.: završio tečaj „Seminar and Hands-on Course of Endovenous Laser / RF Vein Surgery“, Otočec, Slovenija

22. svibnja 2010.: položio ispit za predavača nastavnog predmeta „Pružanje prve pomoći osobama ozlijeđenima u prometnoj nesreći“, Zagreb

Strani jezici:

engleski jezik – aktivno

talijanski jezik – pasivno

Objavljeni radovi

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u SCI časopisima

1. Manojlović, Dragan; Stupin, Ana; Matić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Novak, Sanja; Drenjančević, Ines. The role of epoxyeicosatrienoic acids in diabetes mellitus-induced impaired vascular relaxation of aortic rings in ovariectomized Sprague-Dawley rats // International Journal of Endocrinology, (2019) u tisku (članak, znanstveni).

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Čavka, Ana; Tadžić, Refmir; Grizelj, Ivana; Unfirer, Sanela; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Manojlović, Dragan; Drenjančević, Ines. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. // Medicinski vjesnik. 44 (2012) ; 135-146 (članak, znanstveni).

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu

1. Manojlović, Dragan; Čavka, Ana; Ivanović, Zrinka; Drenjančević, Ines. Hyperbaric oxygen treatment modifies the mechanisms eliciting vasorelaxation to acetylcholine in female diabetic rats // Abstracts of FAME 2011 ; u: Acta Physiologica 202 (2011) (S684). 2011. 73- 74 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

1. Novak, Sanja; Manojlović, Dragan; Mihaljević, Zrinka; Ines Drenjančević. Influence of hyperbaric oxygenation on gene expression in diabetic and healthy female Sprague-Dawley rats // Proceedings of The Physiological Society Proc 37th IUPS London, UK, 2013. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
2. Drenjančević, Ines; Kibel, Aleksandar; Unfirer, Sanela; Ćosić, Anita; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Gros, Mario; Manojlović, Dragan; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina;

Misir, Mihael; Novak, Sanja; Paradžiković, Ivana. Hyperbaric oxygenation - the role of EETs // 3. Congress 83 of Croatian Physiological Society and 1. Regional Congress of The Physiological Societies : abstracts ; u: Periodicum Biologorum 115 (2013) (S2) / Vitale, Branko ; Drenjančević, Ines (ur.). Zagreb, 2013. 26-26 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

3. Manojlović, Dragan; Čavka, Ana; Drenjančević, Ines. Vascular relaxation to acetylcholine in female diabetic rats that underwent hyperbaric oxygenation; the role of EETs and 20-HETE// Proceeding of The Physiological Society 27 London, UK, 2012. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
4. Čavka, Ana; Manojlović Dragan; Lučić, Dejana; Grizelj, Ivana; Drenjančević, Ines. Oestrogen has protective effect on acetylcholine induced relaxation of aortic rings in diabetic rats//Periodicum Biologorum Vol 115, Suppl 2/ Vitale, Branko; Drenjančević Ines (ur.). Zagreb, 2013. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Sažeci u zbornicima skupova

1. Mihaljević, Zrinka; Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Unfirer, Sanela; Manojlović, Dragan; Drenjančević, Ines. Sex differences and sex-hormones role in aortic reactivity to acetylcholine in Sprague-Dawley rats with and without streptozotocin induced diabetes mellitus // 7th TriNet Meeting - Annual Project Review Meeting Abstract Book. 2016. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Poster i sažetak na domaćem znanstvenom skupu

1. Manojlović, Dragan; Drenjančević, Ines. Pulmonary arterial hypertension- new trends in therapy // HINEKA Official Journal of the Croatian Society of Hypertension No 25, Year 12, November 2010 / Jelaković, Bojan (ur.). Zagreb, 2010. str. 55-55 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
2. Manojlović, Dragan; Mihalj, Martina; Drenjančević-Perić, Ines. Peripheral Arterial Disease // CROatian Student Summit- CROSS 6 Zagreb, Hrvatska, 2010. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo)
3. Manojlović, Dragan. Kirurško liječenje perforiranih ventrikularnih i duodenalnih ulkusa u OB Vukovar (2002. - 2010.)// 9th Congress of the Croatian Association of Digestive Surgery. Opatija, Croatia, 2011. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).
4. Kamal, Muhamed; Manojlović, Dragan; Begović, Mario; Tepeš, Marijan; Šuvak, Ivica. Inkarcirana paraezofagealna hiatus hernia- prikaz slučaja // 6th Croatian Congress of Surgery with International Participation, Zagreb, Croatia, 2014. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).

Članstvo u znanstvenim društvima i udrugama:

1. Hrvatsko kirurško društvo
2. Hrvatsko društvo vaskularnih kirurga
3. Hrvatsko društvo za digestivnu kirurgiju
4. Hrvatsko društvo za endoskopsku kirurgiju
5. Europsko društvo vaskularnih kirurg
6. Hrvatsko društvo fiziologa